

# Länsi-Afrikassa eristettyjen monilääkeresistenttien *Enterobacteriaceae*-bakteerien kokogenomisekvensointi

Pro gradu -tutkielma

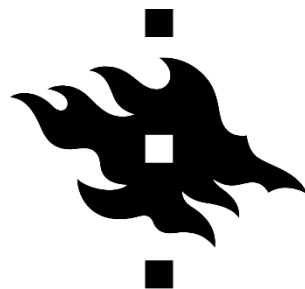
Yleinen mikrobiologia

Molekulaariset ja integratiiviset biotieteet

Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta

Melina Markkanen

20.1.2020



**HELSINGIN YLIOPISTO**

**BIO- JA YMPÄRISTÖTIEDELLINEN TIEDEKUNTA**



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme Biologian koulutusohjelma	
Tekijä – Författare – Author Melina Markkanen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Länsi-Afrikassa eristettyjen monilääkeresistenttien <i>Enterobacteriaceae</i> -bakteerien kokogenomisekvensointi			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Yleinen mikrobiologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu		Aika – Datum – Month and year 20.01.2020	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 87 + liitteet
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Antibioottiresistenssin lisääntymisen myötä yhä useampi kliinisesti merkittävä antibiootti on, ja tulee tulevaisuudessa menettämään tehonsa erilaisten bakteeri-infektioiden hoidossa, mikä tarkoittaa nykyaikaiseen lääketieteeseen johtaneiden saavutusten menettämistä. Globaalissa mittakaavassa yksi merkittävimmistä tietoukoista mitä tulee resistenttien bakteerien esiintyvyyteen sijoittuvat Länsi-Afrikkaan. Kolmannen sukupolven kefalosporiineille ja karbapeneemeille vastustuskykyiset <i>Klebsiella pneumoniae</i>- ja <i>Escherichia coli</i> -kannat voivat aiheuttaa infektoita, joiden hoitoon käytettävissä olevien antibioottien teho ja valikoima on suppea tai olematon. Enterobakteerien vastustuskyky näille antibiooteille on pääosin hajottavien entsyymien kuten laajakirjoisesti beetalaktameja hydrolysoivien ESBL-entsyymien (engl. extended-spectrum beta-lactamases, ESBL) tuoton seurausta. Tässä Pro gradu -työssä tarkoituksena oli selvittää näitä entsyymejä koodaavien geenien sekä muiden antibioottiresistenssigeenien esiintymistä Burkina Fasossa ja Malissa ihmisuloste- ja jätevesinäytteistä eristetyissä <i>K. pneumoniae</i>- ja <i>E. coli</i>-isolaateissa.</p> <p>Kolme enterobakteeri-isolaattia valittiin kokogenomisekvensoitavaksi näille tehtyjen kiekkoherkkyyssmääritystestien mukaisten fenotyyppisten resistenssiprofiilien perusteella. Lukusekvenssit koottiin hahmotelmagenomeiksi ja genomeista tutkittiin isolaattien kantamia antibioottiresistenssigeenejä ja virulenssigeenejä sekä näiden yhteyksiä liikkuviin geneettisiin elementteihin. Lisäksi pangenomi muodostettiin, jotta <i>K. pneumoniae</i> -lajille tyypillisiä piirteitä ja niiden mahdollista roolia korkean tason antibioottiresistenssiä selittävänä tekijänä voitiin arvioida. Pangenomi käsitti kaksi tässä työssä sekvensoitua sekä 12 julkisesta tietokannasta peräisin olevaa genomia.</p> <p>16 kuukauden ikäinen lapsi Burkina Fasossa osoittautui kahden eri monilääkeresistentin ja ESBL-positiivisen – yhden <i>K. pneumoniae</i>- ja yhden <i>E. coli</i> -kannan – suolistokantajaksi. Näistä <i>K. pneumoniae</i> -kannan (isolaatti Burkina_1) kokogenomisekvenssianalyysi vahvisti kyseessä olevan sekvenssityypin ST45 kuuluva muiden resistenssigeenien ohella ESBL-geeniä CTX-M-15 välittävä kanta, jonka geneettiset virulenssiominaisuudet vastasivat aiemmin, vastasyntyneiden sepsisepidemian yhteydessä kuvattuja kantoja.</p> <p>Burkinafasolaisen aikuisen ulostenäytteestä eristettiin monilääkeresistentti, mutta ESBL-negatiivinen <i>K. pneumoniae</i> -kanta (isolaatti Burkina_2), joka ei osoittanut samankaltaisuutta yhdenkään aiemmin kuvatun sekvenssityypin kanssa.</p> <p>Malilaisen lapsen ulostenäytteestä eristetty niin ikään CTX-M-15-geeniä kantava, sekvenssityypin ST38 <i>E. coli</i> (isolaatti Mali_1) osoitti kolmannen sukupolven kefalosporiiniin lisäksi vastustuskykyä jopa viittä eri antibioottiluokkaa edustavaa yhdistettä kohtaan. Samaa aikaan kannan virulenssiprofiili viittasi hybridipatotyypin, jossa yhdistyivät erilaisia infektoita aiheuttaville patogeenisille <i>E. coli</i> -kannoille ominaisia virulenssigeenejä. Näistä merkittävimpinä havaittiin vastasyntyneiden pääasiallisena aivokalvontulehduksen aiheuttajana tunnettuun <i>E. coli</i> -patotyypin (engl. Neonatal Meningitis causing <i>E. coli</i>, NMEC) yhdistettävät virulenssigeenit.</p> <p><i>K. pneumoniae</i> -lajin genomien muovautuvuus voitiin tunnistaa yhtenä mahdollisena suurta antibioottiresistenssigeenitaakkaa selittävänä tekijänä näissä isolaateissa. Liikkuvat geneettiset elementit, kuten plasmidit lisäävät genomisekvenssien vaihtelevuutta horisontaalisen geeninsiirron myötä. Näin ollen tutkielmassa havaittu yhteys antibioottiresistenssigeenien ja liikkuvien geneettisten elementtien välillä puhui sen puolesta, että ulkopuolisen geenimateriaalin hankkiminen lisää välillisesti myös genomissa esiintyvien resistenssigeenien määrää.</p> <p>Tämän Pro gradu -työn tulokset toimivat huolestuttavina esimerkkeinä pienten lasten suolistossaan kantamista, mahdollisesti vakavia infektoita aiheuttavista enterobakteerikannoista, joiden hoitoon käytettävissä olevat lääkevaihtoehdot ovat merkittävästi kaventuneet tai jopa olemattomat maissa, joissa esimerkiksi karbapeneemien saatavuus on heikkoa. Tutkimustulokset ovat linjassa sen vähäisen vastaavan tutkimustiedon kanssa, jota Burkina Fasosta ja Malista on saatavilla.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords antibioottiresistenssi, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , Länsi-Afrikka, kokogenomisekvensointi, isolaatti, virulenssi			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Katariina Pärnänen, Kaisa Haukka, Marko Virta			
Säilytyspaikka – Förvaringsställe – Where deposited HELDA - Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto / HELDA - Helsingfors universitets digitala publikationsarkiv / HELDA - Digital Repository of the University of Helsinki			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Biological and Environmental Sciences		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme Biology	
Tekijä – Författare – Author Melina Markkanen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Whole Genome Sequence Analysis of Multidrug Resistant <i>Enterobacteriaceae</i> Isolated in West Africa			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studienriktning – Subject/Study track General Microbiology			
Työn laji – Arbetets art – Level Master thesis		Aika – Datum – Month and year 20.01.2010	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 87 + appendices
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Constantly increasing level of bacteria becoming resistant to clinically relevant antibiotics challenges the modern medical achievements made over the past century. In global scale, one of the most significant information gaps concerning the occurrence of resistant bacteria is located in West African countries. <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Escherichia coli</i> strains resistant to 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins and carbapenems are a major risk to public health through infections with limited or no available treatment options. The resistance to these antibiotics among <i>Enterobacteriaceae</i> is mainly mediated by hydrolyzing enzymes such as extended-spectrum beta-lactamases (ESBL). The focus of this thesis is to study the genes encoding these enzymes and other resistance factors found in <i>K. pneumoniae</i> and <i>E. coli</i> isolated from human stool and waste water samples in Burkina Faso and Mali.</p> <p>Tree <i>Enterobacteriaceae</i> isolates were selected for whole genome sequence (WGS) analysis based on their phenotypic resistance profiles defined by disk diffusion method. Reads were assembled to draft genomes and the genomes were studied for their antibiotic resistance genes, virulence genes and their associations to mobile genetic elements found in these isolates' genomes. Additionally a pan-genome was created to investigate species specific features of <i>K. pneumoniae</i> and their role in heavy load of antibiotic resistance genes among these isolates. Pan-genome consisted of two genomes sequenced in this study and 12 genomes from the publically available database.</p> <p>16-month old Burkinabe child was a carrier of one ESBL-producing <i>K. pneumoniae</i> (isolate Burkina_1) and one ESBL-positive <i>E. coli</i> along with the resistance to multiple other antibiotics. With genome wide analysis the <i>K. pneumoniae</i> strain could be described as sequence type (ST) 45 representing, multidrug resistant and ESBL-gene CTX-M-15 carrying strain with highly similar virulence gene profile to strains previously described as pathogenic <i>K. pneumoniae</i> causing neonatal sepsis.</p> <p><i>K. pneumoniae</i> isolated from the stool sample of an adult living in Burkina Faso was found to be multidrug resistant, though non-ESBL-producer strain (isolate Burkina_2). The isolate showed no similarity to any previously described sequence type.</p> <p>CTX-M-15 encoding <i>E. coli</i> of ST38 (isolate Mali_1) carried by Malian child showed resistance to five different classes of antibiotics in addition to the 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins. At the same time the isolate showed hybrid virulence gene profile with virulence genes associated to many different <i>E. coli</i> pathotypes including neonatal meningitis causing <i>E. coli</i> (NMEC).</p> <p>The exceptional plasticity of <i>K. pneumoniae</i> genome could be recognized as one of the putative explanations for the high number of resistance genes found among the isolates studied in this work. Antibiotic resistance genes were found to be associated to mobile genetic elements (MGE) and as the genetic plasticity is caused by the acquisition of external genetic material via MGEs such as plasmids, this can lead to indirect accumulation of resistance genes in these genomes.</p> <p>The results in this thesis work show alarming examples of pathogens that potentially cause severe infections, have extremely narrow or no treatment options and are carried by infants. These findings are in line with the few data about the level of faecal carriage of ESBL-producing strains by people in Burkina Faso and Mali reported previously.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords antibiotic resistance, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , West Africa, whole genome sequencing, isolate, virulence			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Katariina Pärnänen, Kaisa Haukka, Marko Virta			
Säilytyspaikka – Förlvaringsställe – Where deposited HELDA - Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto / HELDA - Helsingfors universitets digitala publikationsarkiv / HELDA - Digital Repository of the University of Helsinki			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

# Sisällys

1. Keskeisten termien käyttö tutkielmassa .....	3
2. Lyhenteet .....	4
3. <i>Enterobacteriaceae</i> -bakteeriheimo ja antibioottiresistenssi .....	5
3.1. <i>Enterobacteriaceae</i> -bakteerit ja vastasyntyneet lapset .....	6
3.2. <i>K. pneumoniae</i> -bakteerin virulenssikykyyn vaikuttavat tekijät .....	7
3.3. <i>E. coli</i> -bakteerin virulenssikykyyn vaikuttavat tekijät .....	8
4. Beetalaktaameja hydrolysoivat entsyymit <i>Enterobacteriaceae</i> -bakteereissa .....	10
4.1. ESBL-entsyymit .....	11
4.2. Beetalaktamaasi-inhibiittoreille vastustuskykyiset entsyymit .....	12
4.2.1. IRT- ja CMT-tyypin entsyymit .....	12
4.2.2. AmpC-tyypin entsyymit .....	13
4.3. Karbapenemaasientsyymit .....	13
5. Muut resistenssimekanismit <i>Klebsiella pneumoniae</i> -bakteereissa .....	14
5.1. OmpK-ulkomembraaniporiinit .....	14
5.2. AcrAB-TolC-effluksipumppu .....	15
6. Antibioottiresistenssi ja liikkuvat geneettiset elementit .....	15
7. Antibioottiresistenssin ja virulenssiominaisuuksien välinen suhde .....	16
8. Antibioottiresistenssin tunnistaminen ja käytössä olevien menetelmien puutteet .....	17
9. Antibioottiresistenssi Länsi-Afrikassa ja sen tutkimukseen liittyvät puutteet .....	19
10. AMRIWA-projekti .....	21
11. Työn tarkoitus .....	22
12. Aineisto ja menetelmät .....	22
12.1. Näytteitä koskeva eettinen selvitys .....	23
12.2. Näytteet .....	23
12.3. Näytteiden esikäsittely ja kuljetus Suomeen .....	24
12.4. <i>Klebsiella</i> spp.- ja <i>E. coli</i> -bakteerien valikointi kasvatusmenetelmin .....	25
12.5. Lajintunnistus MALDI-TOF MS – menetelmällä .....	25
12.6. Resistenssiprofiilin määrittäminen kasvatusmenetelmin .....	25
12.6.1. Karbapenemaasi- ja ESBL-tuotannon seulonta- ja varmistustestit .....	26
12.6.2. Muun fenotyyppissä ilmenevän resistenssin selvittäminen .....	28
12.7. Resistenssi- ja virulenssiprofiilien määrittäminen kokogenomisekvensoinnilla .....	28
12.7.1. DNA:n eristys ja sekvensointi .....	29
12.7.2. Sekvenssien esiprosessointi .....	29
12.7.3. Genomien kokoaminen ja geenien funktionaalinen annotaatio .....	29

12.7.4.	Genomien visualisointi Anvi'o-ohjelmalla .....	31
12.7.5.	Yksittäisten <i>K. pneumoniae</i> ja <i>E.coli</i> -isolaattien virulenssigeeniprofiilien vertailut .....	32
12.8.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> -pangenomin muodostus .....	32
12.9.	Pangenomianalyysi ja tilastolliset menetelmät .....	33
13.	Tulokset .....	34
13.1.	<i>K. pneumoniae</i> ja <i>E. coli</i> -kantojen eristys kasvatusmenetelmin.....	34
13.2.	Fenotyyppitysmenetelmän standardointi .....	36
13.3.	Resistenssifenotyypit nanorolaisista ulostenäytteistä eristetyissä isolaateissa .....	38
13.4.	Resistenssifenotyypit Ouagadougossa kerätyistä jätevesinäytteistä eristetyissä isolaateissa.....	38
13.5.	Resistenssifenotyypit bamakolaisista ulostenäytteistä eristetyissä isolaateissa.....	39
13.6.	Kokogenomisekvensointi ja genomien kokoaminen .....	40
13.7.	Kokogenomisekvenssien analysointi .....	41
13.7.1.	Burkinafasolaisen lapsen ulostenäytteestä eristetty <i>K. pneumoniae</i> (isolaatti Burkina_1) .....	41
13.7.2.	Burkinafasolaisen aikuisen ulostenäytteestä eristetty <i>K. pneumoniae</i> (isolaatti Burkina_2) .....	44
13.7.3.	<i>K pneumoniae</i> -isolaattien virulenssigeenit.....	46
13.7.4.	Malilaisen lapsen ulostenäytteestä eristetty <i>Escherichia coli</i> (isolaatti Mali_1) .....	49
13.8.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> -pangenomi .....	53
13.8.1.	Antibioottiresistenssigeenien, virulenssigeenien sekä liikkuvien geneettisten elementtien esiintyvyydet ja suhteet pangenomissa.....	56
14.	Tulosten tarkastelu .....	60
14.1.	Monilääkeresistentit <i>K. pneumoniae</i> -isolaatit Burkina Fasossa .....	60
14.2.	Korkean virulenssin monilääkeresistentti <i>E. coli</i> -isolaatti Malissa .....	63
14.3.	Isolaattien alkuperä.....	65
14.4.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> -genomin ominaisuudet.....	66
14.5.	Kokogenomisekvenssianalyysi menetelmänä .....	68
15.	Liitteet .....	72
16.	Kiitokset .....	72
17.	Kirjallisuus.....	73

# 1. Keskeisten termien käyttö tutkielmassa

## **Antibiootti**

Bakteereita tuhoava tai näiden kasvua hidastava luonnossa esiintyvä tai kliiniseen käyttöön synteettisesti tai puolisynteettisesti valmistettu yhdiste

## **Antibioottiresistenssi**

Bakteerin luontainen tai hankittu ominaisuus, joka mahdollistaa sen selviytymisen tavallisesti bakteerin kasvua estävien antibioottiyhdisteiden läsnäolossa

## **Bakteerikanta**

Bakteerilajin alayksikkö, kyseessä olevan bakteerilajin geneettinen variantti

## **Bakteeri-isolaatti**

Mikrobiologisesta näytteestä, eli bakteerin luonnollisesta ympäristöstä tai mikrobipopulaatiosta eristetty yksittäistä bakteerikantaa edustava yksikkö

## **Beetalaktamaasit**

Bakteerien tuottamia entsyymeitä, jotka kykenevät hajottamaan beetalaktaamirenkaan beetalaktaamiantibioottien rakenteessa

## **ESBL-tuottajakanta (engl. Extended-spectrum beta-lactamase producer)**

Bakteerin hankkima ominaisuus, kyky hajottaa tavanomaista laajempi valikoima antibiootteja

## **Liikkuva geneettinen elementti**

Esimerkiksi antibioottiresistenssigeenejä koodaavia DNA-fragmentteja, joilla on taipumus siirtyä bakteerigenomin sisällä tai eri bakteerilajien välillä

## **Monilääkeresistenssi**

Bakteerin kyky vastustaa antibiootteja, jotka edustavat vähintään kolmesta eri antibioottiluokasta

## **Patotyyppi**

Virulenssiominaisuuksiensa mukainen yhtenäinen patogeenisten *E. coli* -kantojen ryhmä

## **Sekvenssityyppi tai MLST-tyyppi**

Seitsemän konservoituneen nk. ”house keeping” -geenin alleeliprofiileihin perustuva alleeliprofiilimäärittäminen; Saman sekvenssityypin edustajat jakavat saman evolutiivisen historian ja näin todennäköisesti myös osan geneettisistä piirteistään

## **Sideroforit**

Bakteerin raudanhankintaan erikoistuneet virulenssitekijät, kuten yersiniabaktiinit, aerobaktiinit ja enterobaktiinit

## **Virulenssigeeni**

Bakteerin isännän infektiioon liittyviä virulenssitekijöitä koodaavat geenit

## 2. Lyhenteet

<b>AMRIWA</b>	Occurrence, Sources and Prevention of Antimicrobial Resistance in West Africa
<b>CLSI</b>	Clinical & Laboratory Standards Institute
<b>CMT</b>	complex mutant enzymes
<b>EAEC</b>	enteroaggregatiivinen <i>E. coli</i>
<b>EHEC</b>	enterohemorraaginen <i>E. coli</i>
<b>EPEC</b>	enteropatogeeninen <i>E. coli</i>
<b>ESBL</b>	extended-spectrum beta-lactamases; laajakirjoisesti beetalaktaameja hajottavat entsyymit
<b>EUCAST</b>	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>IRT</b>	inhibitor resistant TEM-beta-lactamases; beetalaktamaasi-inhibiittoreille vastustuskykyiset entsyymit
<b>IS</b>	insertion sequence; insertiosekvenssi
<b>MALDI-TOF MS</b>	matriisiavusteinen laser-desorptio-ionisaatio-lentoaika massaspektrometria
<b>MGE</b>	mobile genetic element; liikkuva geneettinen elementti
<b>NMEC</b>	neonatal meningitis causing <i>E. coli</i> ; vastasyntyneillä aivokalvontulehdusta aiheuttava <i>E. coli</i> -kanta
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction; polymeraasiketjureaktio
<b>SCAI</b>	Simmon's Citrate Agar + 1 % Inositol -kasvatusalusta
<b>ST</b>	sequence type; sekvenssityyppi
<b>UPEC</b>	uropatogeeninen <i>E. coli</i>

### 3. *Enterobacteriaceae*–bakteeriheimo ja antibioottiresistenssi

Antimikrobiset yhdisteet käsittävät kaikki luonnossa esiintyvät, puolisynteettiset sekä synteettiset mikrobeja tappavat tai niiden kasvua estävät yhdisteet. Tässä työssä termiä antibiootti käytetään kuvaamaan bakteereita tuhoavia yhdisteitä ottamatta kantaa näiden yhdisteiden alkuperästä. Bakteerien luontaista tai hankittua kykyä vastustaa näiden yhdisteiden tuhoavaa vaikutusta kuvataan tässä termillä antibioottiresistenssi. Hankitun resistenssin lisääntyminen ja leviäminen edelleen lisäävät vastustuskykyisten bakteerien osuutta lajeissa, joissa nämä ominaisuudet eivät esiinny luontaisesti (Peleg ja Hooper 2010). Uudenlaisten resistenssigeenivarianttien ilmaantuminen ihmisen terveyden kannalta merkittävässä bakteerilajeissa on johtanut käsillä olevan globaalin antibioottiresistenssiongelman äärelle (Talebi *et al.*, 2019).

Maailman terveysjärjestö WHO:n (World Health Organization) luokituksen mukaan sekä kolmannen sukupolven kefalosporiineille että karbapeneemeille vastustuskykyiset *Enterobacteriaceae*-bakteeriheimon taudinaiheuttajat lukeutuvat globaalisti laajamittaisinta ja pikaisinta huomiota vaativiksi patogeeneiksi (World Health Organization 2017b).

Laajaan gramnegatiivisista sauvamaisista *Enterobacteriaceae*-heimoon lukeutuvista lajeista erityisesti *Klebsiella pneumoniae* ja *Escherichia coli* aiheuttavat merkittävän osan lukuisille antibiooteille vastustuskykyisten eli monilääkeresistenttien bakteerikantojen aiheuttamista sairaalaepidemioista ympäri maailman (Peleg ja Hooper 2010). Monilääkeresistentin kannan määritelmänä pidetään kykyä vastustaa kolmeen eri antibioottiluokkaan kuuluvaa antibioottia (Magiorakos *et al.*, 2012). Hoitovaihtoehdot näiden monilääkeresistenttien opportunististen patogeenien aiheuttamien infektioiden kohdalla ovat rajatut (Talebi *et al.*, 2019).

Syitä *K. pneumoniae*- ja *E. coli* -bakteerien yleiselle esiintymiselle erityisesti sairaalaepidemioiden aiheuttajina on monia. Ne voivat esiintyä ihmiskehossa toisaalta tavallisena osana esimerkiksi suoliston mikrobiflooraa (Dogra *et al.*, 2015) mutta joissain tapauksissa myös taudinaiheuttajina (Liu *et al.*, 1986). Erityisten virulenssiominaisuuksiensa vuoksi osa kannoista, kuten virulenssiominaisuuksiltaan poikkeavan genotyypin ja fenotyypin eli ilmiäsun omaavat hypervirulentit *K. pneumoniae* -bakteerit voivat aiheuttaa vakavia infektoita myös perusterveessä ihmisessä (Liu *et al.*, 1986).



Sairaalat ovat sekä taudinaiheuttajien että laajamittaisen antibioottien käytön keskittymiä, ja potilaiden sairauksista tai lääkityksestä johtuva heikentynyt immuunipuolustus edesauttaa myös vähemmän virulenttien, antibioottiresistenttien kantojen nopeaa leviämistä näissä ympäristöissä (Peleg ja Hooper 2010). *K. pneumoniae*- ja *E. coli* -lajien selviytymistä antibioottivalintapaineen alaisena selittää osin niille ominainen genomien muovautuvuus (Wyres & Holt, 2018). *K. pneumoniae* -lajilla on taipumus ottaa ulkopuolista geenimateriaalia, niin pieniä korkean kopioluvun kuin suuria matalan kopioluvun plasmideja, osaksi omaa genomiaan (Ramirez *et al.*, 2014). *E. coli* -kantojen genomien plastisuus puolestaan on useimmiten seurausta lateraalista geenien hankkimisesta (Rasko *et al.*, 2008). Yhdessä nämä tekijät luovat puitteet monilääkeresistenttien taudinaiheuttajabakteerien syntyyn. Myös niin kutsuttu yhteisvalinta mahdollistaa monilääkeresistenssin ilmaantumisen (Navon-Venezia *et al.*, 2017). Yhteisvalinnan myötä saman plasmidin koodaamien eri antibioottiresistenssiä aiheuttavien geenien osuus yleistyy myös ilman kyseisen antibiootin aiheuttaman valintapaineen läsnäoloa (Morosini *et al.*, 2006). Vaikka diversiteetin etenkin *K. pneumoniae* -kantojen kesken tiedetään olevan suurta, edustavat merkittäviä sairaalaepidemioita aiheuttavat kannat varsin pientä joukkoa eri sekvenssityyppejä (Wyres *et al.*, 2019).

Resistenttien kantojen vaarallisuutta lisää edelleen kyky hankkia liikkuvien geneettisten elementtien koodaamia virulenssigeenejä osaksi genomiaan (Nicholson *et al.*, 2016). Vaihtoehtoisesti nämä resistenssi- ja virulenssiominaisuudet voivat yhdistyä samassa kannassa resistenssiplasmidin siirtyessä osaksi korkean virulenssin sekvenssityyppejä edustavan bakteerin perimää (Rychlik *et al.*, 2016).

### 3.1. *Enterbacteriaceae*-bakteerit ja vastasyntyneet lapset

Antibiooteille vastustuskykyiset enterobakteerit muodostavat erityisen uhkan vastasyntyneille, joilla infektioalttius on aikuisiin verrattuna suuri (Gasparrini *et al.*, 2019). Suolistomikrobiomi sekä immuunipuolustusjärjestelmä kehittyvät läpi elämän, mutta kehityksen dramaattisimmat muutokset tapahtuvat syntymän jälkeisinä hetkinä (Dogra *et al.*, 2015). Varhaisen kehityksen vaiheilla tiedetään olevan merkitystä koko loppuelämän terveyden kannalta (Dogra *et al.*, 2015). Suolistomikrobiomin ja immuunipuolustusjärjestelmän kehittymättömyydestä johtuen vastasyntyneet ovat myös alttiimpia haitallisten bakteerikantojen kolonisaatiolle (Gasparrini *et al.*, 2019).

Vastasyntyneen lapsen mikrobiomin taksonominen koostumus poikkeaa aikuisen vastaavasta merkittävästi (Asnicar *et al.*, 2017; Dogra *et al.*, 2015). Mikrobiomin dynaaminen ja progressiivinen

kehitys alkaa syntymästä ja saavuttaa ensimmäistä kertaa enemmän tai vähemmän stabiilin tilan noin 12–36 kuukauden iässä (Yatsunenko *et al.*, 2012). Kuten muun muassa Dogra ja kollegat kuvasivat (2015), usein enterobakteerit, ja erityisesti *Klebsiella* spp. -bakteerit, ovat yleisimpiä lapsen suolistomikrobiston lajeja ja dominoivat muutamien ensimmäisten päivien aikana. Kolmannesta viikosta lähtien enterobakteerit väistyvät muun muassa *Bifidobacterium* spp.- ja *Collinsella* spp. -lajien tieltä, jotka ovat tyypillisesti suoliston vallitsevia lajeja noin kuuden kuukauden ikään asti. *Firmicutes*- ja *Streptococcus*-sukujen esiintyvyys pysyy tyypillisesti tasaisesti vähemmistössä tämän aikajänteen sisällä. Elämän ensikuukaudet ja vuodet ovat merkittäviä sen kannalta mitkä bakteerisuvut ja missä suhteessa ne ovat edustettuina muodostuneessa pysyvässä mikrobiomissa.

*Enterobacteriaceae*-lajien runsaudella on yhteys vastasyntyneiden suolistossa esiintyvään bakteerien 16S rRNA geeniin suhteutettuun antibioottiresistenssigeenien runsauteen (Pärnänen *et al.*, 2018). Kuitenkin lapsen suolistomikrobiomin lajiston muuttuessa ajan kuluessa, suolistossa esiintyvistä resistenssigeeneistä muodostuvan resistomin on havaittu säilyvän (Gasparrini *et al.*, 2019; Pärnänen *et al.*, 2018). Tätä on selitetty havainnolla siitä, että yhdessä resistenssigeenien kanssa, lapsi perii äidiltään niitä välittävät liikkuvat geneettiset elementit (Pärnänen *et al.*, 2018). Nämä transposoni- ja insertiosekvenssit sekä plasmidit mahdollistavat antibioottiresistenssigeenien siirtymisestä bakteerisolujen välillä ja jopa eri lajien välillä (Frost *et al.*, 2005).

Mikrobit siirtyvät lapsen ruonsulatuskanavaan pääosin vertikaalisesti tämän äidiltä (Asnicar *et al.*, 2017), mutta synnytyksessä ja sen jälkeen myös ympäristö voi toimia mikrobien lähteenä (Moore *et al.*, 2015; Muroño *et al.*, 1992) Olosuhteista riippuen molemmat mikrobien lähteet saattavat lisätä lapsen riskiä tulla varhain kolonisoiduksi antibioottiresistentillä kannalla.

### 3.2. *K. pneumoniae* -bakteerin virulenssikykyyn vaikuttavat tekijät

Vuorovaikutus isäntäsolujen kanssa on välttämätöntä sekä ihmisessä eläville kommensalisteille että patogeeneille. Isännän infektoimiseen tai vahingoittamiseen johtavaan vuorovaikutukseen erikoistuneita rakenteita kutsutaan virulenssitekijöiksi ja niitä koodaavia geenejä virulenssigeeneiksi. *K. pneumoniae* -bakteerin merkittävimpiin virulenssitekijöihin lukeutuvat muun muassa kapselin paksu verkkomainen polysakkaridirakenne (Fang *et al.*, 2007), fimbriat (Gerlach *et al.*, 1988; Struve *et al.*, 2008), ulkomembraaniproteiinit (Padilla *et al.*, 2010) sekä raudan hankintaan, ja isännän veressä selviytymiseen tarvittavat sideroforit (Bachman *et al.*, 2009).

Kapselilla on monia infektion aloittamiseen ja sen ylläpitoon liittyviä tehtäviä. Se tarjoaa fyysisen esteen ja piilopaikan isännän immuunipuolustusjärjestelmältä ja estää isännän puolustusjärjestelmän dendriittisolujen kypsymistä (Evrard *et al.*, 2010). Lisäksi kapselin polysakkaridi vangitsee isännän immuunipuolustuksen erittämiä antimikrobisia peptidejä ja neutralisoi ne ennen kuin ne tavoittavat bakteerin pinnan (Llobet *et al.*, 2008). *K. pneumoniae* pyrkii eroon bakteerisolun sisään päätyneistä isännän puolustusjärjestelmän erittämistä antimikrobisista peptideistä muun muassa AcrAB-TolC-effluksipumpun avulla, minkä vuoksi tämän pumpun tehokasta toimintaa voidaan pitää myös kannan virulenssikykyä lisäävänä (Padilla *et al.*, 2010).

K1- ja K2-tyypin kapselit koodaavat polysakkaridin ylituotantoa. Näitä kapselityyppejä ilmentävät kannat edustavat lajin hypervirulentteja, myös terveessä ihmisessä vakavia infektioita aiheuttavia *K. pneumoniae* -kantoja (Fang *et al.*, 2007).

Tyypin 1 fimbrat ovat ohuita, kapselin yli ulottuvia ulokkeita, joilla bakteeri tarttuu isäntäsoluihin ja soluväliaineen partikkelihin. Tyypin 1 fimbrat ovat välttämättömiä virtsatieinfektion kannalta (Struve *et al.*, 2008), siinä missä tyypin 3 fimbrioilla on merkittävä rooli biofilmin muodostuksessa, mikä etenkin sairaalavälineistössä kuten katetreissa lisää huomattavasti potilaan riskiä saada *K. pneumoniae* -sairaalainfektio (Gerlach *et al.*, 1988).

Tänä päivänä käsitys patogeenisista *K. pneumoniae* -bakteereista on kapselityyppiin perustuvaa hypervirulentteihin ja ei-hypervirulentteihin kantoihin tehtävää jakoa laajempi. Esimerkiksi bakteerien raudanhankintaan tarvittavien sideroforien, ja näistä erityisesti yersiniabaktiinien, tiedetään olevan merkittävässä roolissa patogeenisten *K. pneumoniae* -kantojen invaasiokyvyn kannalta (Holt *et al.*, 2015). Yersiniabaktiineja ilmentävien *K. pneumoniae* -kantojen on todettu aiheuttavan muun muassa keuhkoinfektioita (Lawlor *et al.*, 2007) sekä verenmyrkytykseen johtavia infektioita pienillä lapsilla (Marando *et al.*, 2018). Vastaavia havaintoja on tehty myös muiden *K. pneumoniae* -lajille tyypillisten sideroforien kohdalla (Bachman *et al.*, 2009).

### 3.3. *E. coli* -bakteerin virulenssikykyyn vaikuttavat tekijät

Klebsiellojen tavoin *E. coli* -bakteerit kolonisoivat usein lapsen suoliston pian tämän syntymän jälkeen (Dogra *et al.*, 2015). Osa *E. coli* -kannoista ilmentää virulenssiominaisuuksia, joiden myötä ne voivat aiheuttaa infektion joko suolistossa aiheuttaen ripulia tai sen ulkopuolella johtaen esimerkiksi virtsatieinfektioihin (Kaper, 2004). Esimerkkejä ripulia aiheuttavista patotyypeistä ovat enterohemorraaginen *E. coli* eli EHEC ja enteroaggregatiivinen *E. coli* eli EAEC (Kaper *et al.*, 2004).

Sen sijaan uropatogeenista UPEC-tyyppiä edustavat kannat aiheuttavat virtsatieinfektioita (Kaper *et al.*, 2004).

Lisäksi oman patotyyppinsä muodostavat vastasyntyneillä pääasiallisena meningiittiä eli aivokalvontulehdusta aiheuttavana NMEC-kantoina tunnetut *E. coli* -bakteerit (engl. Neonatal Meningitis *Escherichia coli*). Aivokalvontulehdukseen edenneillä NMEC-infektioilla on arvioitu olevan noin 10–30 % kuolleisuusaste (Kaper *et al.*, 2004), ja lisäksi korkea vakavien neurologisten jälkitautilien riski (Korhonen *et al.*, 1985). Aikuiset voivat olla NMEC-bakteerien terveitä kantajia, ja NMEC-kannat voivat siirtyä vastasyntyneelle vertikaalisesti tämän äidiltä esimerkiksi synnytyksen yhteydessä äidin NMEC-tyypin bakteerin virtsatiekolonisaation myötä (Zlatkov & Uhlin, 2019).

Yhteisnimitystä ”meningiitti” käytetään lukuisten eri mikrobien aiheuttamista aivokalvontulehduksista. WHO:n koordinoima rokotusprojekti niillä Afrikan alueilla, joissa meningiitin esiintyvyyden osuus on hyvin korkea, tarjoaa suojan ainoastaan laajimmin meningiittiä aiheuttavaa *Neisseria meningitidis* -bakteerin aiheuttamaa aivokalvontulehdusta vastaan (World Health Organization, 2018). Meningiittiä aiheuttavien *E. coli* -kantojen tunnistaminen ei ole ongelmattonta, sillä NMEC-kantojen virulenssigeeniprofiilit eivät muodosta yhtenäistä, yleisesti tunnettua geenien joukkoa, joka yksiselitteisesti erottaisi ne ei-patogeenisista tai muita patotyyppisiä edustavista bakteereista (Logue *et al.*, 2012; Saumya *et al.*, 2015). Myös virulenssigeenien vaihteleva sijainti plasmidien ja kromosomien välillä lisäävät kantojen välistä horisontaalisesta geeninsiirrosta johtuvaa erilaisuutta näiden geenien suhteen (Nicholson *et al.*, 2016). NMEC-kantojen tunnistamisessa on hyödynnetty serotyypitystä, sillä monessa tapauksessa O-serotyypit näiden kantojen kesken rajoittuvat varsin pieneen serotyyppien joukkoon, kuten tyyppeihin O:1, O:7 tai O:18 (Korhonen, *et al.* 1985).

NMEC-kantojen muista kannoista poikkeavat virulenssiominaisuudet perustuvat kykyyn läpäistä aivo-veri-este. Tätä edeltää korkean tason bakteremia eli bakteerien verikolonisaatio (Kim *et al.*, 1992). Näiden virulenssiominaisuuksien kannalta välttämätöntä virulenssigeenien yhdistelmää ei tunneta (Logue *et al.*, 2012; Saumya *et al.*, 2015). Se kuitenkin tiedetään, että bakteremian kehittymisen todennäköisyyteen yhdistettyä kapselityyppiä K1 (Sáez-López *et al.* 2017) ilmentävistä *E. coli* -bakteereista noin 80 % on NMEC-kantoja (Croxen ja Finlay 2010). Isännän aivokudoksen endoteelisolujen invaasioon on puolestaan yhdistetty muun muassa ulkomembraaniproteiini OmpA, tyyppin 1 fimbriat (Prasadarao *et al.*, 1996) sekä Ibe-proteiinit (Logue *et al.*, 2012). Muita NMEC-kannoissa usein esiintyviä virulenssitekijöitä ovat raudanhankintaan erikoistuneet sideroforit, erityisesti aerobaktiinit, jotka auttavat bakteeria selviämään raudan saannin suhteen rajoittuneessa ympäristössä, isännän seerumissa (Nicholson *et al.*, 2016). Edellä mainittujen sekä lukuisten muiden

virulenssitekijöiden esiintyvyys NMEC-kantoja ja toisaalta muiden *E. coli* -patotyyppisiä edustavien kantojen kesken vaihtelee kirjallisuudessa suuresti (Xu *et al.*, 2019; Logue *et al.*, 2012; Nicholson *et al.*, 2016; Saumya *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2008).

#### 4. Beetalaktaameja hydrolysoivat entsyymit *Enterobacteriaceae*-bakteereissa

Beetalaktaamit muodostavat maailmanlaajuisesti eniten käytettyjen antibioottien luokan (World Health Organization 2018b). Beetalaktaameihin luetaan kuuluvaksi kaikki antimikrobiset yhdisteet, joissa esiintyy beetalaktaamirengasrakenne, kuten penisilliinijohdannaiset, kefalosporiinit, monobaktaamit sekä karbapeneemit. Niiden vaikutus kohdistuu penisilliiniä sitoviin proteiineihin (engl. penicillin binding proteins, PBP), jotka ovat vastuussa soluseinäsynteesin loppuvaiheista, joissa transpeptidaasien muodostamat ristsidokset johtavat soluseinän peptidoglykaanirakenteen muodostumiseen (Tipper & Strominger, 1965). Antibiootin sitoutuminen PBP:n aktiivisen kohdan seriiniin estää peptidiketjujen ristsidoksien muodostumisen (Tipper & Strominger, 1965).

Penisilliinin tuloa markkinoille vuonna 1946 seurasi lukuisten muiden beetalaktaamiantibioottien kehittäminen. Vastustuskyvyn lisääntyessä kliinisesti merkittävien lajien keskuudessa, ensimmäisen sukupolven kefalosporiinien kehittämistä (Abraham & Newton, 1961) on sittemmin seurannut toisen, kolmannen, neljännen ja lopulta viidennen sukupolven kefalosporiinien kehittäminen (World Health Organization 2017a). Antibioottien tehon laajakirjoisuus on lisääntynyt aina sukupolvelta toiselle siirtyessä. Yhä laajempikirjoisten kefalosporiinien käytöstä johtuen laajakirjoisesti beetalaktaameja hajottavia entsyymejä tuottavien bakteerien (engl. extended spectrum beta-lactamases, ESBL) lisääntyminen on nopeasti kaventanut käytettävissä olevien antibioottien valikoimaa (Paterson ja Bonomo 2005).

Beetalaktaameja hydrolysoivien beetalaktamaasi-entsyymien tuotanto on gramnegatiivisten basillien yleisin resistenssimekanismi (Bush ja Jacoby 2010). Kuten Ambler vuonna 1980 kuvasi, beetalaktamaasit ovat joukko globulaarisia proteiineja, jotka aminohapposekvenssiensä vaihtelevuudesta huolimatta jakavat keskenään samankaltaisen kolmiulotteisen rakenteen. Nämä entsyymit hydrolysoivat kaikille beetalaktaameille yhteisen rengasrakenteen amidisidoksia, jolloin antibiootti menettää tehonsa (Ambler 1980).

Beetalaktamaaseja on jaoteltu niiden molekulaarisien ominaisuuksien perusteella niin kutsuttuihin Ambler-luokkiin. Tämä jako ei kuitenkaan ota kantaa entsyymien aiheuttamiin

resistenssifenotyypeihin. Sen sijaan Bush-Jacob-Madeiros-luokittelu lajittelee beetalaktamaasit näiden substraattien mukaisesti (Bush ja Jacoby 2010).

#### 4.1. ESBL-entsyymit

Ensimmäiset ESBL-entsyymit olivat seurausta vain muutamien aminohappojen mutaatioista kapeakirjoisia beetalaktamaaseja SHV-1, TEM-1 ja TEM-2 koodaavissa geneissä, joita monet gramnegatiiviset bakteerit ilmentävät kromosomissaan luontaisesti (Bush *et al.*, 1995). Näiden geenien plasmidivälitteinen leviäminen aiheuttikin suuren osan sairaalaepidemiaista ensimmäisten ESBL-tuottajakantojen ilmaantumisen aikoihin (Bradford 2001). Etuliitettä *bla* on käytetty erottamaan nimenomaan plasmideissa leviäviä beetalaktamaasigeenejä. Nykypäivän käsitys beetalaktamaasigeenien erisuuntaisesta siirtymisestä niin plasmidien kuin kromosomien välillä kuitenkin tekee tästä merkintätavasta epäpätevän, minkä vuoksi siitä on osin luovuttu (Cantón *et al.* 2012). Myös tässä työssä etuliitettä ei käytetä, sillä kaikissa tapauksissa geenin sijainnista plasmidissa tai kromosomissa ei voida olla varmoja.

Tänä päivänä SHV- ja TEM-tyypin entsyymit ovat väistyneet aivan viime vuosikymmeninä globaalilla tasolla nopeasti yleistyneiden CTX-M-tyypin ESBL-entsyymien, etenkin *CTX-M-15*-geenivariantin tieltä (Cantón *et al.*, 2006). CTX-M-geenit ovat siirtyneet ympäristössä ja ihmisen kommensalisteina esiintyvistä *Kluyvera* -suvun bakteerilajien kromosomeista kliinisesti merkittäviin lajeihin (Humeniuk *et al.*, 2002) liikkuvien geneettisten elementtien välityksellä useita kertoja evolutiivisessa historiassa (Cantón *et al.*, 2012). Antibioottivalinnan seurauksena ne ovat erilaistuneet uusissa kantajabakteereissaan edelleen ja yleistyneet nopeudella, jota on kuvattu jopa ”CTX-M-pandemiaksi”.

Nimensä mukaisesti (engl. cefotaxime, CTX) CTX-M-entsyymit antavat kantajalleen korkean vastustuskyvyn erityisesti kefotaksiimiantibioottia kohtaan. *Kluyvera* -lajeissa CTX-M-geenin alkuperäistä geeniä vastaavan *klu*-geenin ekspressio on usein hyvin matalalla tasolla, sillä sen ilmentyminen vaatii vahvan promoottorin (Cantón *et al.*, 2012). Erityisesti *ISEcp1*-insertiosekvenssin tiedetään toimivan sekä CTX-M-tyypin geenien mobilisoijana että edellytyksenä geenin ilmentymiselle kohdebakteerissa (Humeniuk *et al.*, 2002). Insertiosekvenssistä CTX-M-tyypin geeniin suhteen ylävirtaan asettuva promoottori indusoi geenin ilmentymistä kohdesekvenssissä (Cantón *et al.*, 2012). Lartigue ja kollegat (2006) havaitsivat geenin siirtymisen *K. pneumoniae* -bakteeriin lisääntyvän *in vitro* -kokeissa stressitekijöiden, kuten korotetun lämpötilan tai

antibioottialtistuksen myötä, mikä herättää kysymyksiä globaalin ilmastolämpenemisen ja antibioottien käytön lisääntymisen vaikutuksista geeniin siirtymiseen uusiin kliinisesti merkittäviin lajeihin.

CTX-M-tyypin geenit ovat usein lukuisia muitakin resistenssigeenejä välittävien IncFII-plasmidityypin kuljettamia (Sandegren *et al.*, 2012). Näiden suurten plasmidien on tiedetty olevan hyvin sopeutuneita *Enterobacteriaceae*-lajeihin jo ennen ensimmäisiä havaintoja CTX-M-tyypin geenien laajamittaisesta plasmidivälitteisestä leviämisestä (Datta *et al.*, 1980).

## 4.2. Beetalaktamaasi-inhibiittoreille vastustuskykyiset entsyymit

Beetalaktamaasi-inhibiittorit estävät bakteerien tuottamien entsyymien, pääosin SHV- ja TEM-tyypin beetalaktamaasien toimintaa, minkä vuoksi niitä käytetään infektioiden hoidossa yhdessä beetalaktaamiantibioottien kanssa annosteltuna (Rupp ja Fey 2003). Esimerkkejä tavallisimmista beetalaktamaasi-inhibiittoreista ovat klavulaanihappo sekä tatsobaktaami.

Kykyä vastustaa beetalaktamaasi-inhibiittoreita esiintyy niin kapeakirjoisesti beetalaktaameja hajottavien kuin ESBL-entsyymejä ja karbapenemaaseja tuottavien kantojen keskuudessa (Robin *et al.*, 2006). Nämä inhibiittoriresistentit bakteerikannat saattavat tuottaa vääriä negatiivisia tuloksia kasvatusmenetelmiin perustuvien tehtävissä ESBL-kantojen seulontatestissä, mikäli näiden havaitsemiseksi suositeltuja lisätestejä ei käytetä (Martinez-Martinez *et al.*, 2017; Rupp & Fey, 2003). Beetalaktaami-beetalaktamaasi-inhibiittorikombinaatiohoidon käyttöä ESBL-tuottajakantojen aiheuttamissa infektioissa on perusteltu muun muassa karbapeneemien ylikäytön välttämiseksi. Toisaalta laaja yhdistelmähoitojen käyttö puolestaan lisää inhibiittoriresistenttien kantojen esiintymistä (Rupp ja Fey 2003).

### 4.2.1. IRT- ja CMT-tyypin entsyymit

Inhibiittoriresistentit TEM-tyypin entsyymit (engl. inhibitor resistant TEM beta-lactamases) ovat seurasta pistemutaatioista alkuperäisissä, kapeakirjoisesti beetalaktaameja hydrolysoivissa TEM-1- tai TEM-2-entsyymeistä koodaavissa sekvensseissä. Klavulaanihapporesistenssistä huolimatta IRT-entsyymit säilyttävät herkkyytensä kolmannen sukupolven kefalosporiineja kohtaan. Silloin tällöin, joskin harvoin, tavataan myös monimutkaisista mutaatioista syntyneitä beetalaktamaasi-inhibiittoreille sekä kolmannen sukupolven kefalosporiineille vastustuskykyisiä, niin kutsuttuja

CMT-entsyymejä tuottavia kantoja (engl. complex mutant TEMs) tuottavia kantoja (Robin *et al.*, 2006).

Joissain tapauksissa *K. pneumoniae* -kantojen kohdalla myös vahvan promoottorin aiheuttama *SHV-I*-geenin korkean tason ilmentyminen voi johtaa inhibiittori-resistentin fenotyypin syntyyn (Rice *et al.*, 2000; Shannon *et al.*, 1990).

#### 4.2.2. AmpC-tyypin entsyymit

AmpC-tyypin entsyymit kykenevät hajottamaan lukuisia eri beetalaktaamiantibiootteja. Lisäksi klavulaanihappo ei inhiboi näiden entsyymien toimintaa, toisin kuin muiden beetalaktamaasientsyymien tapauksessa (Coudron *et al.*, 2000). AmpC:tä koodaavat geenit ovat tavallinen osa lajien *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* sekä *Pseudomonas aeruginosa* kromosomia, jossa niiden ilmentyminen jää tavallisesti kuitenkin hyvin matalalle tasolle. (Philippon *et al.*, 2002). Kuitenkin joissain tapauksissa niiden ylituotanto saa kannassa aikaan vastustuskyvyn beetalaktamaasi-inhibiittoreita vastaan. *AmpC*-geenin sisältämän plasmidin horisontaalinen hankkiminen voi johtaa AmpC-tyypin resistenssiprofiiliin myös muissa lajeissa. Ensimmäinen kromosomista mobilisoitunut AmpC-entsyymiä koodaava CMY-geeni havaittiin vuonna 1989 (Bauernfeind *et al.*, 1989). Plasmidivälitteistä AmpC-entsyymien tuotantoa löydetään sekä *E. coli*- että *K. pneumoniae* -bakteereissa.

#### 4.3. Karbapenemaasientsyymit

Karbapeneemiantibiootit poikkeavat muista beetalaktaamiantibiooteista biokemiallisilta ominaisuuksiltaan sekä laajemman substraattivalikoimansa puolesta (Nordmann *et al.*, 2011). Karbapeneemeista ensimmäisinä markkinoille saapui vuonna 1985 imipeneemi (Birnbau *et al.*, 1985). Noin vuosikymmenen ajan karbapeneemeja käytettiin ainoastaan vaikeiden infektioiden hoidossa, niin kutsuttuina ”viimeisen vaihtoehdon antibiootteina”. Kolmannen sukupolven kefalosporiinien liikakäyttö, ja siitä seurannut lisääntynyt antibioottiresistenssi on johtanut karbapeneemiantibioottien käytön yleistymiseen myös empiirisenä hoitovaihtoehtona (Trifi *et al.*, 2018). Tämä on erityisen huolestuttavaa, sillä uudenlaisten antibioottien kehittäminen on jo hidastunut, ja tulee hidastumaan edelleen merkittävästi aiempaan verrattuna (Talebi *et al.*, 2019).



*Enterobacteriaceae*-bakteerien alentunut herkkyys karbapeneemiantibiootteja kohtaan voi olla seurausta monen tekijän yhteisvaikutuksesta (Pulzova *et al.*, 2017) tai kuten usein, vain karbapenemaasientsyymituotannon ansiota. Karbapenemaasientsyymeistä merkittävimpiin lukeutuvat muun muassa suurelta osin vain *K. pneumoniae* -sekvenssityypin ST258 välittämä KPC-2 entsyymi (engl. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) (Kitchel *et al.*, 2009), NDM-1 (New Delhin tyyppin 1 metallobeetalaktamaasi) (Yong *et al.*, 2009), IMP-karbapenemaasit (Osano *et al.*, 1994) sekä VIM-1-tyypin karbapenemaasientsyymit (Cornaglia *et al.*, 2000).

OXA-48-tyypin karbapenemaasientsyymit on nimetty laajimmalle levinneen varianttinsa mukaisesti (Poirel *et al.* 2012). Vaikka näiden entsyymien karbapeneemihydrolyysiaktiivisuus on edellä mainittuja entsyymejä heikompi, osa beetalaktamaasi-inhibiittoreista ovat tehottomia OXA-48-entsyymejä kohtaan (Poirel *et al.* 2012). Lisäksi geenien levinneisyys on lisääntynyt nopeasti sitten ensimmäisen havainnon vuonna 2001 (Pitout *et al.*, 2005). Tämä on ollut mahdollista geenejä usein kantavien laajaisäntäkirjoisten plasmidien sekä geenejä mobilisoivien, tehokkaita promoottorisekvenssejä kantavien insertiosekvenssien myötä (Aubert *et al.*, 2006).

## 5. Muut resistenssimekanismit *Klebsiella pneumoniae* -bakteereissa

Muutokset kromosomaalisesti koodattujen effluksipumppujen toiminnassa (Padilla *et al.*, 2010) tai ulkomembraaniporiinien läpäisevyydessä (Wong *et al.* 2019) auttavat bakteeria välttämään sille haitallisia yhdisteitä. Nämä mutaatioiden myötä syntyneet ominaisuudet voivat tarjota kantajabakteerilleen resistenssifenotyyppin myös ilman hydrolysoivia entsyymejä koodaavia geenejä. Esimerkiksi yhdessä ESBL-entsyymituotannon kanssa ulkomembraanin muutokset voivat joissain tapauksissa johtaa karbapeneemiresistenssiä ilmentävien kantojen syntyyn (Dossim *et al.*, 2019; Pulzova *et al.*, 2017).

### 5.1. OmpK-ulkomembraaniporiinit

Poriinit ovat gramnegatiivisen bakteerin kaksoiskalvon läpäiseviä ulkomembraaniproteiineja, joiden pääasiallinen tehtävä on kontrolloida soluun aktiivisesti sisään otettavia yhdisteitä ja toisaalta mahdollistaa aineiden passiivinen diffuusio kanavan läpi (Doménech-Sánchez *et al.*, 1999). *K. pneumoniae*-lajin porieneista merkittävimpiä ovat OmpK35 sekä OmpK36, joille homologisia porineja *E. coli* -bakteereissa edustaa OmpF ja OmpC (Doménech-Sánchez *et al.*, 1999). Ravinteet

diffuntoituvat bakteerisolujen sisälle näiden poriinien läpi, mutta myös osa antibioottiyhdisteistä, kuten karbapeneemit kykenevät tätä kautta läpäisemään solukalvot (Doménech-Sánchez *et al.*, 1999; Pulzova *et al.*, 2017).

Toisinaan OmpK35- ja OmpK36-poriinien puutetta kompensoidaan vaihtoehtoisten poriinien ilmentämisellä ravinnonsaannin turvaamiseksi näissä *K. pneumoniae* -kannoissa. Näistä OmpK37-poriinit ovat tavallinen löydös beetalaktaameille vastustuskykyisissä *K. pneumoniae* -kannoissa (Doménech-Sánchez *et al.*, 1999). Bakteri, jossa kapeakanavaisten OmpK37-poriinien ilmentyminen korvaa täysin, suurempien molekyylien läpäisyn sallivien OmpK35 ja OmpK36-poriinien ilmentymisen, osoittaa alentunutta herkkyyttä kefotaksiimia ja kefoksitiinia kohtaan (Doménech-Sánchez *ym.* 1999).

## 5.2. AcrAB-TolC-effluksipumppu

*Enterobacteriaceae*-bakteerien pääosin RND-pumppuihin kuuluvista (engl. resistance-nodulation-division efflux pump) effluksipumpuista AcrAB-TolC -kompleksi on *K. pneumoniae* -lajille tavallisin, ja *E. coli* -bakteerissa sitä vastaa samaa nimeä kantava homologi (Padilla *et al.* 2010). Muiden yhdisteiden lisäksi antibioottien ulosvirtaus näissä pumpuissa on protonigradientin ajamaa (Nikaido ja Takatsuka 2008). AcrAB-kompleksin säätely tapahtuu sitä koodaavan *acrAB*-operonissa sijaitsevan *acrR*-repressorigeenin avulla, ja mutaatiot tässä *acrR*-geenissä voivat johtaa esimerkiksi AcrB-proteiinin yli-ilmentymiseen, ja edelleen kykyyn vastustaa erityisesti kinoloniantibiootteja (Padilla *et al.*, 2010; Schneiders *et al.*, 2003). AcrAB-TolC-pumpun merkitystä karbapeneemiresistenssin kannalta ei ole todistettu, mutta sitä on kuitenkin spekuloitu yhtenä siihen mahdollisesti vaikuttavana tekijänä (Gröbner *et al.*, 2009).

## 6. Antibioottiresistenssi ja liikkuvat geneettiset elementit

Antibioottiresistenssigeenien vastaanottaminen ja leviäminen bakteerikannoissa on suurelta osin solun sisäisesti insertiosekvenssien, transposonien ja integronien sekä solujen välisesti plasmidien ja bakteriofaagien geneettistä materiaalia liikuttavien elementtien ansiota (Domingues *et al.*, 2012; Partridge *et al.*, 2018). Lisäksi nämä liikkuvat geneettiset elementit ovat mahdollistaneet tämän päivän merkittävimpinä pidettyjen resistenssigeenien alkuperäisen siirtymisen kliinisesti merkittävien bakteerilajien kantamiksi. Maailman yleisimpänä pidettyjen CTX-M-tyypin ESBL-

geenien siirtymisen *Kluyvera* spp. -lajeista enterobakteereihin on arvioitu tapahtuneen jopa yhdeksän kertaa evolutiivisen historian aikana (Cantón *et al.*, 2012). Liikkuvien geneettisten elementtien tutkiminen resistenssin yhteydessä on näin ollen monin tavoin perusteltua.

Insertiosekvenssit (IS-elementit) muodostuvat vain yhdestä tai muutamista geneistä, ja näiden geenien ilmentymistä kohdegenomissa säätelevästä promoottorisekvenssistä (Glansdorff *et al.*, 1981). IS-elementtien kohdesekvenssinä toimii kromosomin sijaan yleensä plasmidi, mikä lisää niiden siirtämien geenien leviämisen todennäköisyyttä edelleen (Siguier *et al.*, 2014). CTX-M-tyyppin entsyymien levittämisen kannalta merkittävien *ISEcpI*-elementtien (Cantón *et al.*, 2012) rinnalla muita resistenssigeenejä kuljettavia insertiosekvenssejä ovat muun muassa IS26- ja IS91-tyyppin elementit (Ford ja Avison 2004).

Plasmidien niin kutsuttu ydinsekvenssi (engl. "backbone") muodostuu plasmidin replikaatioon tarvittavien geenien lisäksi usein horisontaalisen geeninsiirron mahdollistavista geeneistä (Thomas 2000). Antibioottiresistenssigeenit tai muut plasmidin selviytymistä erilaisissa olosuhteissa hyödyttäviä ominaisuuksia koodaavat geenit sijaitsevat puolestaan plasmidin vaihtelevan sekvenssin alueella (Carattoli, 2009; Sandegren *et al.*, 2012). Eri plasmidityypeillä on erilainen taipumus kantaa resistenssigeenejä (Carattoli, 2009; Partridge *et al.*, 2018)

Vaikka plasmidit aloittavat replikaationsa itsenäisesti, käyttävät ne monesti kromosomaalista replikaatiokoneistoa DNA-synteesiinsä, mikä tekee niistä jonkin verran valikoivia isäntäsolunsa suhteen (Partridge *et al.*, 2018). Enterobakteereissa yleiset replikonityypin IncF plasmidit tunnetaan muun muassa beetalaktamaasigeenien kantajina (Rozwandowicz *et al.*, 2018). *Enterobacteriaceae* -lajit voivat kuitenkin kantaa laajalti niin pieniä korkean kopioluvun herkästi mobilisoituvia plasmideja kuin suuriakin matalan kopioluvun plasmideja (Carattoli 2009).

## 7. Antibioottiresistenssin ja virulenssiominaisuuksien välinen suhde

Korkean tason virulenssia ja korkean tason antibioottiresistenssiä ilmentävien *Klebsiella pneumoniae* -kantojen on havaittu kehittyvän toisistaan erillisissä klonaalisissa ryhmissä (Bialek-Davenet *et al.*, 2014). Esimerkiksi hypervirulenssia, ja muutoin keskimääräistä korkeampaa virulenssia esiintyy useammin ESBL-negatiivisissa kuin positiivisissa kannoissa (Yu, *et al.*, 2015). Syyksi tälle Yu kollegoineen esittää ESBL-kantojen plasmidien korkeamman mutaatiofrekvenssin, ja siitä mahdollisesti seuraavan hypervirulenssiin yhdistettyjen *rmpA*- ja *rmpA2*-geenien mutatoitumiseen ja ilmentymisen menettämiseen. Wyres ja Holt (2018) puolestaan ehdottavat hypervirulenssiin liittyvän

runsaan kapselituotannon hidastavan ulkopuolisen DNA:n sisäänottoa. Viime aikoina kuitenkin hypervirulentteja *K. pneumoniae* -kantoja, jotka lisäksi kantavat ESBL-geeniä *CTX-M-15* (Shin & Ko, 2013) tai karbapenemaasigeeniä *KPC-2* (Dong *et al.*, 2018) on raportoitu leviävän sekvenssityypissä ST23 maailmanlaajuisesti aiheuttaen sairaalaepidemioita.

Virulenssi- ja resistenssigeenien harvinaista päällekkäistä esiintymistä on selitetty myös näistä ominaisuuksista aiheutuvan bakteerin kelpoisuuden alenemisen avulla (Hennequin ja Forestier 2007). Kuitenkin ristiriidassa tämän kanssa kromosomaalisten virulenssigeenien ilmentymisen on havaittu jopa vahvistuvan joissain *Enterobacteriaceae*-kannoissa ESBL-plasmidin omaksumisen myötä (Schaufler *et al.*, 2016).

## 8. Antibioottiresistenssin tunnistaminen ja käytössä olevien menetelmien puutteet

Herkkyyismääritystestejä joko kiekkotestien tai mikrodiluutiotestien muodossa on pidetty standardimenetelmänä jo useamman vuosikymmenen ajan (Matuschek *et al.*, 2013). Rutiininomaisessa kliinisessä työssä ne tarjoavat riittävän tarkan tiedon, jotta oikeanlainen diagnoosi ja hoitopäätös, esimerkiksi antibioottien valinta, voidaan tehdä kohtuullisessa ajassa. Lisäksi testien suorittamiseen ei tarvita erityistä asiantuntijuutta ja laboratorioresursseja tarvitaan vain vähän.

Kuitenkin viime vuosikymmenten aikana kliinisesti merkittävien bakteerien kyky vastustaa antibiootteja on sekä lisääntynyt että monipuolistunut, eikä resistenssin pelkkä fenotyyppinen määrittäminen enää tuota kaikkea tarvittavaa tietoa etenkin resistenssin seurantajärjestelmien kannalta (Ellington *et al.*, 2017; Köser *et al.*, 2012). Molekulaarisilla menetelmillä voidaan tunnistaa alentuneen karbapeneemiherkkyyden aiheuttava mekanismi ja esimerkiksi välttyä perinteisten herkkyysmääritystesteissä pääosin AmpC-tuottajabakteerien aiheuttamilta vääriltä negatiivisilta tuloksilta (Martinez-Martinez, *et al.* 2017). Lisäksi tieto resistenssiä aiheuttavista geeneistä on välttämätöntä, mikäli antibioottiresistenssiongelman lähteitä ja etenemisreittejä halutaan ymmärtää niin yksittäisten epidemioiden tapauksessa kuin globaalissakin mittakaavassa. PCR-menetelmät vastaavat klinisen työn lisävaatimuksiin, mutta niiden käyttöön liittyy niin ikään rajoitteita. Nämä lisäresursseja sekä henkilökunnan asiantuntijuutta vaativat menetelmät tuottavat tietoa vain rajatusta määrästä valittuja resistenssigeenejä. Odottamattomia tai uudenlaisia geenivariantteja ei PCR-menetelmin näin ollen havaita (Ellington *et al.*, 2017).

Myös proteiinien massaspektriprofiilien vertailuun perustuvia MALDI-TOF MS -menetelmiä on kehitetty karbapenemaasi- (Akyar *et al.*, 2019), ESBL- ja AmpC-entsyymien tunnistamiseen (Correa-Martínez *et al.* 2019). Näiden menetelmien käyttöönottoa rajoittaa standardoitujen menetelmien puute sekä se, että beetaaktamaasien tunnistamisessa käytettävät asetukset poikkeavat esimerkiksi lajinmäärityksessä käytettävistä, mikä aiheuttaa käytännön ongelmia samalla kun MALDI-TOF-laitteiden korkea hinta rajoittaa useamman laitteen hankkimista samassa yksikössä (Martinez-Martinez, *et al.* 2017).

Bakteerien seuraavan sukupolven kokogenomisekvensoinnin kustannukset ovat laskeneet eksponentiaalisesti viimeisen 20 vuoden aikana, mikä on tehnyt menetelmästä mahdollisen vaihtoehdon yhä useammalle laboratoriolle (Wetterstrand, 2019). Antibioottiresistenssitutkimuksen kontekstissa vastustuskykyisten bakteerien kokogenomianalyysi tarjoaa tietoa, jota voidaan hyödyntää etenkin näiden kantojen epidemiologisen tai jopa evolutiivisen taustan selvittämisessä. Tällaisen tiedon toivotaan tarjoavan lisää ymmärrystä ja työkaluja sairaalaepidemioiden esiintymisen välttämiseen muun muassa seurantajärjestelmän muodossa (Schürch ja van Schaik 2017). Lisäksi tietäen bakteerin antibiootteja vastustavien mekanismien monimutkaisuuden koko genomien kattavaa tietoa voidaan käyttää apuna aiemmin tuntemattomien resistenssifenotyyppiin tai virulenttiin ilmiösuun johtavien tekijöiden tunnistamisessa.

Kliinisessä työssä kokogenomisekvensoinnin hyödyntäminen on kuitenkin yhä vähäistä. Tälle Reuter (2013) sekä Balloux (2018) kollegoineen ovat nimenneet lukuisia syitä. Vaikka sekvensoinnin hinta on pudonnut huomattavasti, voi hinta yhä näyttäytyä liian korkeana sairaaloille, joissa bioinformatiikan analyysihin vaadittavien resurssien riittämättömyydestä johtuen kokogenomisekvensoinnin koko potentiaalia ei pystytä hyödyntämään. Bioinformatiikkaan asiantuntijuuden lisäksi monilta sairaaloilta saattaa puuttua sopiva laskentainfrastruktuuri. Lisäksi suurena hidasteena toimii bioinformatiikan menetelmien epäyhtenäisyys sekä standardoitujen menetelmien ja näiden akkreditoinnin puute. Myös suurissa määrin syntyvän sekvenssitiedon hallittuun säilöntään ja jakamiseen tulisi olla valmiudet.

Itse sekvensointiin ja genomisekvenssien kokoamiseen liittyvien laatukriteerien lisäksi antibioottiresistenssin selvittämisen kohdalla standardimenetelmien puutteet liittyvät kykyyn ennustaa kannan resistenssin ilmiösu tämän genotyypin perusteella. Seuraukset kuvatuista puutteista tulevat esiin muun muassa Doylen ja kollegoiden vastikään (2019) julkaisemissa tutkimustuloksissa. Ainoastaan kymmenen osallistujalaboratorion havaittiin tuottavan jo varsin heterogeenisiä tuloksia antibioottiresistenssin arvioimisessa kokogenomisekvensointianalyysin avulla. Osa poikkeavuuksista oli seurausta erilasten genomien kokoamiseen ja laaduntarkkailuun käytettyjen menetelmien

eroavaisuuksista eri laboratorioden välillä. Myös resistenssigeenien määrittämisessä käytetyt eri tietokannat johtivat tulosten heterogeenisyyteen laboratorioden välillä. Tutkimuksen merkittävin havainto oli asiantuntijuuden puute geenitiedon perusteella tehtävästä resistenssifenotyypin ennustamisessa. Tämä vahvisti edelleen yhtenäisten resistenssitietokantojen sekä akkreditoitujen menetelmäohjeiden tarvetta, mitä myös EUCAST-komitea painottaa (Ellington *et al.*, 2017). Resistenssimekanismien päällekkäisyyksien lisäksi erityisesti *Enterobacteriaceae*-bakteeriheimon edustajien kohdalla lisähaastetta tuo horisontaalisen geeninsiirron aiheuttama variaatio myös lajien sisällä, minkä vuoksi esimerkiksi mutaatioiden vaikutusten arviointi fenotyypissä havaittavan resistenssin kannalta on vaikeaa.

## 9. Antibioottiresistenssi Länsi-Afrikassa ja sen tutkimukseen liittyvät puutteet

Kuten WHO:n vuonna 2017 julkaisema raportti (World Health Organization, 2017) osoittaa, saatavilla oleva tieto antibioottiresistenssistä ei jakaudu maantieteellisesti tasaisesti. Siinä missä Euroopan tilanne on varsin hyvin dokumentoitu, tieto resistenssin esiintyvyydestä etenkin terveen väestön kesken on hyvin rajallista tai täysin puutteellista monissa Afrikan valtioissa. Raportti tuo esiin eri Afrikan alueiden kattavien, valtiollisten systemaattisten resistenssin seurantaohjelmien puuttumisen Afrikan mantereella. Syiksi seurantaohjelmien puuttumiselle raportissa esitetään tieteellisten verkostojen puutteet, rajalliset laboratoriokapasiteetit sekä yleinen eriasteinen tiedonpuute antibioottiresistenssiin liittyvistä riskeistä.

Virallisten seurantajärjestelmien puuttuessa tieto antibioottiresistenssin tilasta näillä aluilla perustuu yksittäisiin tieteellisiin julkaisuihin. Osassa julkaisuissa havaittavat puutteet, kuten pienet otoskoot, tai rajalliset laboratoriomenetelmät, saattavat tuottaa vain karkean arvion antibioottiresistenssin todellisesta tilasta alueella. Lisäksi monet raporteista ovat vuosia tai vuosikymmeniä vanhoja, mikä on merkittävä puute huomioiden antibioottiresistenssin nopean etenemisen.

Huolestuttavasti, yhtä aikaa tutkimustiedon puutteellisuuden kanssa, monet antibioottiresistenssin lisääntymiseen yhdistetyt riskitekijät ovat läsnä juuri Länsi-Afrikassa. Lääkäreiden diagnostisilla päätöksillä ja hoidollisilla valinnoilla on usein empiirinen pohja mikrobiologisten laboratoriotutkimusten sijaan. Lisäksi puutteellisesta hygieniasta johtuen sairaalakäynnit muodostavat jo itsessään riskin ESBL-positiivisen enterobakteerin kolonisaation kannalta

(Ouédraogo *et al.*, 2016; Sangare *et al.*, 2017). Lisäksi aliravitsemuksen on todettu lisäävän ESBL-kannan kolonisaation riskiä esimerkiksi Malissa (Woerther *et al.*, 2011).

Toistaiseksi karbapeneemiantibioottien saatavuutta monissa Länsi-Afrikan kohteissa rajoittaa jonkin verran muun muassa niiden kallis hinta (Manenzhe, *et al.* 2015). Tästä huolimatta esimerkiksi Burkina Fason rajanaapurissa Togossa vuoden 2016 aikana eri syistä sairaalassa olleista potilaista eristetyistä *Enterobacteriaceae*-isolaateista yli viisi prosenttia oli vastustuskykyisiä karbapeneemeille (Dossim *et al.*, 2019). Valtaosa resistenteistä kannoista tuotti OXA-48-tyypin karbapenemaasientsyymiä. Karbapeneemiresistenssiä havaittiin kuitenkin myös kannassa, joka tuotti ainoastaan CTX-M-15-geenin koodaamaa ESBL-entsyymiä, mutta osoitti lisäksi muutoksia solukalvon läpäisevyydessä. Koska läpäisevyyttä lisäävillä poriinimuutoksilla on havaittu olevan bakteerin ravinnonsaannin myötä kannan kelpoisuutta alentavia vaikutuksia (Wong *et al.*, 2019), Dossimin ja kollegoiden havaintoa voidaan mahdollisesti pitää todisteena karbapeneemiantibioottien käytöstä johtuvasta valintapaineen läsnäolosta kyseisessä sairaalaympäristössä.

Kustannussyistä johtuen paikallisesti tuotettujen karbapeneemilääkkeiden laatu ja teho eivät välttämättä yllä optimaaliselle tasolle (Manenzhe *et al.*, 2015), mikä johtaa infektion nujertamisen sijaan antibioottiresistenssin lisääntymiseen. Karbapeneemiresistenttien enterobakteerien esiintyvyydestä Malissa ja Burkina Fasossa ei ole julkaistu laajamittaista tutkimustietoa.

Sen lisäksi että ESBL-kantajuus on tavallista sairaaloissa, se on huolestuttavan yleistä myös terveen väestön keskuudessa Länsi-Afrikassa (Hendriksen *et al.*, 2019; Ouedgraogo *et al.*, 2017). Tämän vuoksi myös pienten lasten ESBL-bakteerien kolonisaation riski on suuri äitien ollessa usein kantajia (Bulabula *et al.*, 2017; Chereau *et al.*, 2015). Suolistoperäisen ESBL-bakteerin kantajuus mahdollistaa kyseisen kannan aiheuttaman infektion kehittymisen (Gorrie *et al.*, 2017).

Jätevesiä ympäri maailmaa tutkivassa julkaisussa Hendriksen ja kollegat (2019) raportoivat terveen väestön resistenssigeenien tason olevan korkeinta juuri Afrikan mantereella. Afrikassa jätevesien kaikista antibioottiresistenssigeenit olivat lisäksi vaihtelevimmat eri geenien suhteen ja poikkesivat muun muassa Euroopan ja Pohjois-Amerikan vastaavista pääosin korkeiden tetrasykliini-, beetalaktaami-, aminoglukosidi- sekä sulfa-trimetopriimiresistenssigeenipitoisuuksien osalta. Hendriksen ja kollegat keskittyivät tutkimaan resistenssigeenejä sen mukaan mille antibioottiluokan antibiootille ne antavat vastustuskyvyn, minkä vuoksi esimerkiksi kapea- ja laajakirjoisesti beetalaktaameja hajottavia entsyymejä koodaavia geenejä ei ollut mahdollista erottaa toisistaan. Maantieteellisesti laaja tutkimusasetelma salli myös resistenssin ja yhteiskunnallisten tekijöiden yhteyden selvittämisen. Hendriksen ja kollegat havaitsivat resistenssigeenien runsauden olevan

yhteydessä muun muassa väestön yleiseen terveydentilaan sekä viemärintijärjestelmien toimivuuteen.

Länsi-Afrikassa antibiootteja myydään ilman reseptiä jopa katukaupoissa (Anand *et al.*, 2019). Resurssien sekä yleisen tietoisuuden puuttuessa antibioottikuureja ei aina syödä loppuun vaan osa tableteista saatetaan säästää niin sanotusti ”pahan päivän varalle” (Anand *et al.*, 2019). Lisäksi paikallisesti tai lähialueilla tuotettujen lääkkeiden laatu ja teho voivat vaihdella (Manenzhe *et al.* 2015). Näistä syistä johtuen antibioottien käytön todellista määrää, ja näin ollen merkitystä resistenssin kehittymisen kannalta näillä alueilla on vaikea arvioida.

Paikallisiin kulttuuriin, kuten tapoihin harjoittaa eri elinkeinoja, liittyy monia mahdollisia antibioottiresistenssin lisääntymistä ja leviämistä edistäviä riskitekijöitä. Esimerkiksi rajoittamaton antibioottien käyttö kalanviljelyssä ja lihantuotannossa mahdollistaa eläinperäisten monilääkeresistenssiä ilmentävien patogeenien leviämisen (Alonso *et al.*, 2017).

## 10. AMRIWA-projekti

Englanninkielistä nimeä “Occurrence, Sources and Prevention of Antimicrobial Resistance in West Africa” kantava (lyh. AMRIWA) on monitieteellinen konsortio, joka pyrkii ratkaisemaan antibioottiresistenssiin liittyviä ongelmia Länsi-Afrikassa <https://blogs.helsinki.fi/culturesofcultures/amriwa/>. AMRIWA-projektissa

antibioottiresistenssiongelman esiintymiseen ja sen syihin ja seurauksiin pureudutaan niin mikrobiologisesta kuin sosiologisesta näkökulmasta. Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää antibioottiresistenssin esiintyvyyttä sekä siihen johtavia tekijöitä valtioissa, joissa antibioottiresistenssin seurantajärjestelmää ei ole ja tutkimuksen resurssit ovat yleisesti ottaen varsin rajalliset.

Mikrobiologisen tutkimuksen tavoitteisiin kuuluu resistenttien bakteerien kuvaaminen mikrobigeneettisin menetelmin niin ihmisten kantamien kuin ympäristössä esiintyvien bakteerien kautta näillä alueilla. Projektin sosiologinen tutkimustyö keskittyy selvittämään antibioottiresistenssin lähteitä sekä leviämistä edesauttavia toimia yksilötasolla sekä yhteiskunnallisesta näkökulmasta. Keraamalla havaintoja paikallisten arjesta ja toiminnasta, jota esimerkiksi eri elinkeinojen yhteydessä harjoitetaan, voidaan saada arvokasta mikrobiologista tutkimusta tukevaa tietoa vastustuskykyisten bakteerien lisääntymiseen johtavista tekijöistä maissa, joissa resistenssin taso on korkea.



Projektin tavoitteena on edistää paikallisten tietämystä antibioottien käyttöön liittyvistä negatiivisista vaikutuksista ja resistenssiongelman merkityksestä. Vaikka antibioottiresistenssi on globaali ongelma, eivät sen vastustamiseen käytettävissä olevat resurssit jakaudu tasaisesti maanosien välillä. Näin ollen AMRIWA -projektin toimijat tuntevat vastuun ja velvollisuuden toimia paikallisten osaamista ja tietämystä lisäävästi yhteisen resistenssiongelman ratkaisemiseksi. Tämä Pro gradu -työ on toteutettu osana AMRIWA-konsortion projektia Malissa ja Burkina Fasossa.

## 11. Työn tarkoitus

Työ noudatteli edellä mainittuja AMRIWA-projektille asetettuja yhteisiä tavoitteita. Tarkoituksena oli lisätä kuvailevaa tutkimustietoa Burkina Fasossa ja Malissa esiintyvien vastustuskykyisten bakteerien mikrobiologisista ominaisuuksista kokogenomisekvensoinnin avulla. Tämän Pro gradu -työn avulla tuotetun tiedon avulla voitiin suunnitella projektin tulevien näytteiden analysointia. Lisäksi työn tavoitteena oli vertailla perinteisten bakteeriviljelymenetelmiin perustuvien sekä sekvensointimenetelmiin perustuvien menetelmien tuottamia tuloksia.

Lyhyesti, fenotyyppisten menetelmien sekä kokogenomisekvensoinnin avulla työssä pyrittiin selvittämään vastauksia kysymyksiin:

1. Mitä ESBL- ja/tai karbapenemaasigeenivariantteja ihmisperäisissä *Enterobacteriaceae*-bakteereissa Burkina Fasosta ja Malista peräisin olevissa näytteissä esiintyy?
2. Mille muille antibiooteille isolaatit osoittavat vastustuskykyä?
3. Minkälainen rooli *K. pneumoniae* -bakteerille lajityypillisillä genomien ominaisuuksilla on antibioottiresistenssin kannalta?
4. Onko liikkuvilla geneettisillä elementeillä yhteys resistenssigeenien runsauteen?
5. Minkälaisia virulenssiominaisuuksia isolaatit kantavat?
6. Minkälaista epidemiologista geneettistä taustaa sekvensoidut kannat edustavat?
7. Vastaavatko genotyyppiset ja fenotyyppiset resistenssiprofiilit toisiaan?
8. Miten kokogenomisekvenssianalyysi resistenssin ennustamisessa vertautuu muihin menetelmiin?

## 12. Aineisto ja menetelmät

## 12.1. Näytteitä koskeva eettinen selvitys

Työssä käytettyjen ihmisulostenäytteiden luovuttajilta ei kerätty henkilöllisyyttä paljastavia tietoja, ainoastaan henkilön ikä ja sijainti näytteen keräyshetkellä. Näytteiden keräys on toteutettu Burkina Fason ja Malin eettisen toimikunnan antaman luvan mukaisesti. Eettisten toimikuntien lausunnot on esitetty Pro gradu -työn suunnitelman liitteissä S1 (Burkina Faso) ja S2 (Mali).

## 12.2. Näytteet

Työssä tutkitut näytteet olivat peräisin kahdesta eri Länsi-Afrikan valtiosta, Burkina Fasosta ja Malista (Taulukko 1). Burkina Fasossa ulostenäytteet keräsi Zakaria Garba yhteistyössä paikallisen vesi- ja viemärlaitoksen (ONEA) kanssa (jätevesinäytteet) ja Malissa Lassina Timbine. Burkina Fasossa näytteiden keruut sijoittuivat ajankohdille 21.1.–25.1.2019 (ulostenäytteet) sekä 4.2.–5.2.2019 (jätevesinäytteet) ja Malissa ajalle 31.1.2019 (ulostenäytteet).

Burkina Fasossa kerätyt ulostenäytteet olivat peräisin yhdeltä 16 kuukauden ikäiseltä lapselta sekä kahdelta eri aikuiselta. Lisäksi työssä tutkittiin kolmessa eri kohteessa Burkina Fasossa kerättyjä jätevesinäytteitä. Ulostenäytteet luovuttaneet henkilöt olivat näytteenottohetkellä Nanoron maaseutukaupungin Saint Camillen sairaalassa, Burkina Fason keski-osassa. Lapsella oli oireita ripulista ja toisella aikuisista vatsakivusta. Kolmannen henkilön hoidontarpeen syystä ei ollut tietoa.

Kolmesta Burkina Fason Ouagadougoussa kerätystä jätevesinäytteestä ensimmäinen oli peräisin jätevedestä Yalgadon yliopistollisen sairaalassa, joka on noin 800 sängypaikallaan Burkina Fason kansallinen ja samalla suurin sairaala (Lankoandé *et al.*, 2018) Jätevedet Yalgadon sairaalasta kerätään yhteen kokoomaviemäriin ja johdetaan ONEA:n jätevedenpuhdistamolle. Ouagadougoun asukasluku on nopeassa kasvussa ylittäessään vuonna 2019 2,6 miljoonan asukkaan rajan (<http://worldpopulationreview.com/world-cities/ouagadougou-population>, luettu 13.11.2019).

Kaksi muuta jätevesinäytteiden keräyskohdetta Ouagadougoussa olivat teurastamossa jonkin asteisen esikäsittelyn läpikäynyt jätevesi sekä kaupungin jätevettä useista lähteistä yhteen kokoava vesien risteymäkohta. Kustakin Burkina Fasosta peräisin olevasta näytepisteestä oli käytettävissä kolme rinnakkaisnäytettä.

Lisäksi työssä tutkittiin Malin pääkaupungissa Bamakossa sijaitsevassa Yirimadjon terveyskeskuksessa kerättyjä neljän 4-5 kuukauden ikäisen lapsen ulostenäytteitä. Näistä lapsista kahta oli näytteenkeräyshetkeen mennessä ruokittu ainoastaan rintamaidolla. Sen sijaan toiset kaksi

lasta olivat olleet sekaruokinnassa. Muuta tietoa esimerkiksi lasten terveydentilasta ei ollut saatavilla. Näytteistä ei ollut käytettävissä rinnakkaisia näytteitä.

**Taulukko 1. Työssä käytetyt näytteet.** Ihmisulostenäytteet oli kerätty terveyskeskuksissa, kahdessa eri kohteessa, Burkina Fason Nanorossa sekä Malin Bamakossa. Valtaosassa tapauksista luovuttajien terveydentilasta ei ollut tietoa. Jätevesinäytteet olivat peräisin Ouagadougousta, Burkina Fasosta. Kohteet olivat sairaala, teurastamo sekä jätevesiviemärien risteymäkohta.

Näyte	Sijainti	Ajankohta	Näytetyyppi	Potilaan ikä	Lisätiedot
BF17A BF17B BF17C	Burkina Faso, Afrikka Nanoro, Saint Camillen sairaala	21.1.-25.1.2019	uloste	16 kk	terveydentila: ripuli
BF18A BF18B BF18C	Burkina Faso, Afrikka Nanoro, Saint Camillen sairaala	21.1.-25.1.2019	uloste	aikuinen	terveyden tila: ei tiedossa
BF19A BF19B BF19C	Burkina Faso, Afrikka Nanoro, Saint Camillen sairaala	21.1.-25.1.2019	uloste	aikuinen	terveydentila: vatsakipu
BF12A BF12B BF12C	Burkina Faso, Afrikka Yalgadon yliopistollinen sairaala, Ouagadougou	4.2.-5.2.2019	jätevesi		sairaala, jäteveden poistoputki
BF13A BF13B BF13C	Burkina Faso, Afrikka Ouagadougou	4.2.-5.2.2019	jätevesi		saapuvan jäteveden risteymäkohta
BF15A BF15B BF15C	Burkina Faso, Afrikka Ouagadougou	4.2.-5.2.2019	jätevesi		teurastamo, esikäsitelty jätevesi
M12A M12B M12C M12D	Mali, Afrikka Yirimadjon terveyskeskus, Bamako	31.1.2019	uloste	4-5 kk 4-5 kk 4-5 kk 4-5 kk	sekaruokinta sekaruokinta rintaruokinta rintaruokinta

### 12.3. Näytteiden esikäsittely ja kuljetus Suomeen

Ulostenäytteet kerättiin 15 millilitran näyteputkiin. Säilyvyyden parantamiseksi ennen -80 °C asteeseen siirtämistä näytteisiin lisättiin 20 % glyseroliliuosta.

Johtuen jätevesinäytteiden hyödyntämisestä myös tämän Pro gradu -työn ulkopuolisissa AMRIWA-tutkimuksissa, näytteiden käsittely noudatteli näissä tutkimuksissa käytettäviä esikäsittelymenetelmiä: Näytteiden sentrifugoinnin jälkeen supernatanttia poistettiin niin, että putken pohjalle kertynyt pelletti voitiin uudelleen suspensoida pelletin yläpuolelle jääneeseen nesteeseen (tilavuudeltaan noin 1–5 millilitraa). Näytteisiin lisättiin glyserolia siten, että saatiin 20 %

loppukonsentraatio ja ne säilytettiin -80 °C asteessa niiden kuljetusajankohtaan asti. Edellä kuvatuista esikäsittelyvaiheista Burkina Fasossa vastasi Anniina Sarekoski yhdessä paikallisten opiskelijoiden kanssa.

Kaikki näytteet kuljetettiin Helsinkiin lentorahtina kuivajäihin pakattuna.

#### 12.4. *Klebsiella* spp.- ja *E. coli* -bakteerien valikointi kasvatusmenetelmin

*Enterobacteriaceae*-bakteereista erityisesti *Klebsiella* spp. ja myös *E. coli* -lajien eristämässä uloste- ja jätevesinäytteistä hyödynnettiin kasvatusmenetelmään perustuvaa selektiota. Antibioottivalintaan perustuvien selektiomenetelmien sijaan isolaattien valikoinnissa hyödynnettiin eri hiilen lähteitä, sitraattia ja inositolia, sisältävää Simmon's Citrate Agar + 1 % Inositol- eli SCAI-kasvatusalustaa (Van Kregten *et al.*, 1984). *Klebsiella* spp. -bakteerit kykenevät hyödyntämään näistä molempia, mutta *E. coli* vain inositolia. Maljakasvatusta edelsi lisäksi gramnegatiivisten sauvabakteerien selektio ampisilliiniantibiootin avulla, mikä mahdollisti usein luontaisesti ampisilliiniresistenttien etenkin *K. pneumoniae*- mutta myös *E. coli* -kantojen valikoimisen. Noin 10 mikrolitraa sulatettua näytettä siirrostettiin 10 millilitraan lurialientä, johon oli lisätty ampisilliinia 0,1 %:n (v/v) loppukonsentraatiossa. Tätä yön yli (24 h) 37 °C:ssa kasvatettua näytettä levitettiin 100 µl:n tilavuudessa selektiiviselle SCAI-kasvatusalustalle. Näytteitä inkuboitin 37 °C:ssa kaksi vuorokautta (48 h). Kaikki työssä käytettyjen kasvatusalustojen valmistusohjeet on esitetty liitteessä 3.

#### 12.5. Lajintunnistus MALDI-TOF MS – menetelmällä

Eristetyt isolaatit määritettiin laji- tai sukutasolle matriisiavusteisella laser-desorptio-ionisaatio-lentoaika massaspektrometrialla eli MALDI-TOF MS -menetelmällä (Bruker Daltonics Inc, GmbH, Bremen, Saksa) (Carbonnelle *et al.*, 2010). Tätä varten kustakin näytteestä peräisin olevien SCAI-maljoilla kasvaneiden pesäkkeiden joukosta valittiin kaikki morfologisesti toisistaan poikkeavat pesäkkeet, mikä tarkoitti noin yhdestä neljään pesäkettä kutakin näytettä kohden. Lajimääritys tehtiin yhden vuorokauden (24 h) lysogenia-agarilla (Liite 3) kasvaneista pesäkkeistä. Työssä käytettiin Helsingin yliopistollisen pieneläinsairaalan MALDI-TOF -laitetta Thomas Grönthalin avustuksella.

#### 12.6. Resistenssiprofiilin määrittäminen kasvatusmenetelmin

Isolaattien fenotyyppiset resistenssi-profiilit määritettiin *Enterobacteriaceae*-bakteereille EUCAST-komitean (European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing) laatiman ohjeen (Martinez-Martinez *et al.*, 2017) mukaisesti ESBL- ja karbapenemaasituottajakantojen selvittämiseksi. Kiekkoherkkyyssmäärityksessä noudatettiin EUCAST-menetelmäohjetta vuodelta 2019 (EUCAST 2019b). Lyhyesti, yön yli (24 h, 37 °C) ei-selektiivisellä ravinne-agar-kasvatusalustalla (Liite 3) kasvanutta bakteerimassaa kerättiin steriilin puuvillapäisen puikon avulla siten, että suolaliuokseen (0,9 % (v/v) NaCl) liuotettuna se vastasi sameudeltaan noin 0,5:n McFarlandin yksikköä. Bakteerikasvustoa poimittiin kolmesta eri yksittäispesäkkeestä kutakin näytemaljaa kohden, jotta mahdollisen heteroresistenssin aiheuttama virhelähde tuloksissa voitiin minimoida. Bakteerisuspensiota levitettiin Müller-Hinton-kasvatusalustalle (Liite 3) pinnan mukaisin vedoin kolmessa eri, toisilleen vastakkaisessa suunnassa kasvuston ohjeiden mukaisen peittävyysasteen saavuttamiseksi. Antibioottikiekot (Thermo Scientific™ Oxoid™) asetettiin riittävän etäälle toisistaan, jotta antibioottien epätoivotuilta yhteisvaikutuksilta voitiin välttyä. Herkkyyssmäärityksmaljoja kasvatettiin  $18 \pm 2$  tuntia 37 °C:ssa, jonka jälkeen tulokset luettiin välittömästi EUCAST:n määrittämien kliinisten raja-arvojen mukaisesti (EUCAST 2019a). Herkkyys tetrasykliiniä kohtaan arvioitiin EUCAST:lle vaihtoehtoisen CLSI standardimenetelmän mukaisesti (CLSI, 2019, [www.clsi.org](http://www.clsi.org)), sillä EUCAST ei enää tarjoa kliinisiä raja-arvoja tetrasykliiniresistenssille.

#### 12.6.1. Karbapenemaasi- ja ESBL-tuotannon seulonta- ja varmistustestit

Kantojen karbapenemaasientsyymien tuotanto selvitettiin käyttäen meropeneemi (MEM) ja imipeneemi (IMP) kiekkoja (Martinez-Martinez, *et al.*, 2017). Kaikki määrityksessä käytetyt antibioottikiekot on esitetty taulukossa 2.

**Taulukko 2. Kiekkoherkkyyssmäärityksessä käytetyt antibiootit.** Taulukossa on esitetty kussakin testissä käytetyt antibioottikiekot, näiden sisältämät antibioottikonsentraatiot sekä antibiootin antibioottiluokka.

Testi	Yhdiste	Konsentraatio (µg)	Lyhenne	Antibioottiluokka
Karbapenemaasin tuoton seulonta	meropeneemi	10	MEM-10	karbapeneemi
	imipeneemi	10	IMP-10	karbapeneemi
ESBL:n tuoton seulonta	kefotaksiimi	5	CTX-5	3. polven kefalosporiini
	keftatsidiimi	10	CAZ-10	3. polven kefalosporiini
	keftriaksoni	30	CRO-30	3. polven kefalosporiini
ESBL:n tuoton varmistus	amoksisilliini + klavulaanihappo	30	AMC-30	penisilliini
	kefotaksiimi	30	CTX-30	3. polven kefalosporiini
	keftatsidiimi	30	CAZ-30	3. polven kefalosporiini
	kefepiimi	30	FEP-30	4. polven kefalosporiini
	atstreonaami	30	ATM-30	monobaktaami
Muut	ampisilliini	10	AMP-10	penisilliini
	gentamysiini	10	CN-10	aminoglykosidi
	siprofloksasiini	5	CIP-5	fluorokinoloni
	tetrasykliini	30	TE-30	tetrasykliini
	sulfa-trimetopriimi	25(1:19)	SXT-25	sulfonamidi, dihydrofolaatireduktaasi- inhibiittori

ESBL-positiivisten enterobakteerien tunnistamiseksi suoritettiin EUCAST:n kaksiosainen kiekkoherkkyysmäärittelyyn perustuva testaus. Kolmea eri kolmannen polven kefalosporiinia, kefotaksiimia (CTX, 5 µg), keftatsidiimia (CAZ, 10 µg) sekä keftriaksonia (CRO, 30 µg) käytettiin osoittamaan todennäköiset ESBL-positiiviset kannat, jotka tutkittiin edelleen kaksoiskiekkotestillä ESBL-positiivisuuden varmistamiseksi (Martinez-Martinez *et al.* 2017).

EUCAST:n suosittelemat kontrollikannat tilattiin Saksasta, DSMZ:n mikrobi- ja solukantakokoelmasta (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). Aiemmin tehdyn karakterisoinnin (Rasheed *et al.*, 2000) mukaan tässä käytetty positiivinen kontrollikanta *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603 (Lot. No. DSM 26371-0518-001) kantaa geeniä *SHV-18* ja ilmentää näin ollen ESBL-fenotyyppiä. Lisäksi sen tiedettiin olevan vastustuskykyinen muun muassa tetrasykliinille.

ESBL-fenotyyppin suhteen negatiivisena kontrollina käytettiin kantaa *Escherichia coli* ATCC® 25922 (Lot. No. DSM 1103-0219-001), jonka tiedettiin kasvavan kahtena stabiilina, mutta morfologialtaan toisistaan poikkeavana pesäkemuo-tona (Minogue *et al.*, 2014). Molempia morfologioita ilmentävät kannat testattiin varmuuden vuoksi erikseen kontaminaation poissulkemiseksi. Eri morfologiset tyypit on tässä työssä merkitty kirjaimin ”V” (vahva) sekä ”L” (läpikuultava). Kontrollikantoja käsiteltiin kuten kaikkia muitakin näytteitä aina MALDI-TOF MS -tunnistuksesta fenotyyppisen resistenssiprofiilin määrittämiseen.

ESBL-kannan varmistuksessa käytetyn kaksoiskiekkotestin kiekkoparit sisälsivät amoksisilliini/klavulaanihappo (AMC 30 µg) -yhdistelmäkiekkot ja vaihtoehtoisesti joko keftatsidiimi

(CAZ 30 µg), kefotaksiimi (CTX 30 µg), kefepiimi (FEP 30 µg) tai atstreonaami (ATM 30 µg) - kiekot. Kiekkoparien välinen etäisyys oli 25 millimetriä. Virallisia standardeja AmpC-tuottajakantojen tunnistamiseen ei ole (Martinez-Martinez *et al.*, 2017). EUCAST:n suosituksen mukaisesti kuitenkin neljännen polven kefalosporiinin, kefepiimin sekä monobaktaameihin lukeutuvan atstreonaamin käytöllä pyrittiin tässä lisäämään testin tarkkuutta AmpC-entsyymien tuottajabakteerien todennäköisemmällä tunnistamisella (Martinez-Martinez *et al.*, 2017). Kaksoiskiekkotestin tulosten tulkinta perustui eri antibioottien ja näiden inhibiittoreiden yhteisvaikutuksesta syntyvän ellipsin muotoisen estovyöhykkeen läsnäoloon tai poissaoloon. Ensimmäinen voitiin tulkita positiivisena ja jälkimmäinen negatiivisena tuloksena isolaatin ESBL-tuotannon suhteen.

#### 12.6.2. Muun fenotyypissä ilmenevän resistenssin selvittäminen

Isolaattien kattavan fenotyypin resistenssiprofiilin selvittämiseksi karbapenemaasi- ja ESBL-entsyymituotannon lisäksi kantojen herkkyydet myös muita kuin edellä mainittuja antibiootteja kohtaan testattiin. Näitä olivat ampisilliini (AMP 10 µg), gentamysiini (CN 10 µg), siprofloksasiini (CIP 5 µg), tetrasykliini (TE 30 µg) sekä trimetopriimin ja sulfametoksatsolin yhdistelmä sulfa-trimetopriimi (SXT 25 µg), ja ne edustivat antibioottiluokkia penisilliinit, aminoglykosidit, fluorokinolonit, tetrasykliinit sekä sulfonamidit (Taulukko 2). Antibiootit valittiin niiden kliinisen merkittävyyden perusteella sekä siten, että ne edustivat mahdollisimman laajasti eri antibioottiluokkia.

#### 12.7. Resistenssi- ja virulenssiprofiilien määrittäminen kokogenomisekvensoinnilla

Neljä antibioottiresistenssiprofiileiltaan erilaista bakteeri-isolaattia valittiin kokogenomisekvensointiin. Näitä isolaatteja kuvataan työssä nimillä Burkina\_1, Burkina\_2, Burkina\_3 ja Mali\_1. Kaksi ensimmäistä olivat peräisin Nanoron sairaalassa (Burkina Faso) olleiden ihmisten ulostenäytteistä, yksi 16-kuukauden ikäisen lapsen (Burkina\_1) (Taulukko 1: näyte BF17C) ja toinen aikuisen luovuttamasta näytteestä (Burkina\_2) (Taulukko 1: BF19A). Kolmas isolaateista oli kerätty niin ikään Burkina Fasossa, Yalgadon sairaalan jäteveden ulostuloviemäristä (Burkina\_3) (Taulukko 1: BF12C). Viimeinen valituista isolaateista oli Malin Bamakossa terveyskeskuksessa olleen 4-5 kuukauden ikäisen lapsen ulostenäytteestä eristetty bakteerikanta (Mali\_1) (Taulukko 1: M12C). Isolaateista kolme ensimmäistä edustivat lajia *K. pneumoniae* ja viimeinen lajia *E. coli*.

### 12.7.1. DNA:n eristys ja sekvensointi

Mahdollisimman korkean DNA-konsentraation saavuttamiseksi isolaatteja kasvatettiin yön yli ravistelussa (24 h, 37 °C, 180 rpm) neljässä rinnakkaisessa 10 ml:n ravinnekasvatusliemessä (Liite 3). DNA:n eristys tehtiin erikseen kustakin samaa isolaattia vastaavasta, neljästä rinnakkaisesta bakteerisuspensiosta 1 ml:n tilavuudessa QIAamp® DNA Mini Kit -eristyskitillä (Qiagen, Hilden, Saksa), valmistajan ohjeita (Qiagen 2016) mukaillen. Reagenssien väliaikaisesta puutteesta johtuen ohjeesta poikettiin siten, että näytteiden Burkina\_1 ja Burkina\_2 kohdalla eristetty DNA eluoitiin steriiliin veteen, siinä missä näytteiden Burkina\_3 ja Mali\_1 eluoinnissa käytettiin AE-puskuria, kuten ohjeessa. DNA-konsentraatiot mitattiin sekä NanoDrop-fluorospektrometrillä että Qubit-fluorometrillä.

Kokogenomisekvensointi tehtiin tilauksesta Biotekniikan Instituutissa, Helsingin yliopistossa (DNA Sequencing and Genomics Laboratory of the University of Helsinki). DNA-kirjasto valmistettiin siellä Nextera XT DNA -kirjastonvalmistuskitillä (Illumina). Sekvensointi tehtiin molempiin suuntiin Illumina MiSeq -tekniikalla käyttäen lukusekvenssipituuksia 2 x 300 bp ja pyrkien satakertaiseen lukusyvyyteen.

Raakadata on koottu European Nucleotide Archive (<https://www.ebi.ac.uk/ena>) -tietokantaan salatun projektin PRJEB36112 alle. Data on saatavilla pyynnöstä allekirjoittaneelta.

### 12.7.2. Sekvenssien esiprosessointi

Nextera-kirjaston transposaasiadapterisekvenssit (CTGTCTCTTATACACATCT) poistettiin molemman suuntaisista sekvensseistä. Lisäksi sekvenssit siistittiin poistamalla huonolaatuiset ja lyhyet lukusekvenssit CutAdapt-työkalulla (Marcel, 2011, versio 1.10). Adapterisekvenssien poiston onnistuminen sekä sekvenssien laatu ennen ja jälkeen niiden poiston tarkistettiin FastQC-ohjelmalla (Andrews, 2010, versio 0.11.8). Kaikki työn bioinformatiikan vaiheet ajettiin Linux-komentorivillä, ja eri vaiheissa käytetyt komennot on koottu liitteeseen 4. Työn bioinformatiikkaosuuden laskenta tehtiin kokonaisuudessaan CSC:n (Tieteen tietotekniikan keskus) laskentaympäristöissä.

### 12.7.3. Genomien kokoaminen ja geenien funktionaalinen annotaatio



Lukusekvenssit koottiin genomiksi *de novo* -menetelmällä hyödyntäen useasta eri bioinformatiikan työkalusta muodostuvaa INNUca -ohjelmaa (Machado *et al.* versio 3.1). INNUca:n itsenäiset, mutta toisiinsa kytketyt moduulit vastaavat genomien kokoamisen lisäksi sekä sekvenssien että luonnosgenomin laadun arvioimiseen sekä mahdollisen kontaminaation havaitsemiseen liittyvistä tehtävistä (Llarena *et al.*, 2017). Työssä INNUca ajettiin virtuaalikoneessa hyödyntämällä niin kutsuttua säiliöintiä eli käyttöjärjestelmätason virtualisointia (Docker-ohjelmalla) (engl. containerization). Genomien kokoamisen onnistumista arvioitiin Quast-komentoriviohjelmalla (Mikheenko *et al.*, 2018, versio 5.0.2).

Avoimet lukukehykset tunnistettiin Prodigal-työkalulla (Hyatt *et al.*, 2010, versio 2.6.3) ja koodaavat sekvensseille tehtiin funktionaalinen annotointi eli sekvenssikuvaukset eri tietokantoja vastaan NCBI:n BLAST -komentorivityökalulla (Camacho *et al.*, 2009, versio 2.6.0). Antibioottiresistenssiin liittyviä tekijöitä etsittiin kahden eri tietokannan avulla. Ainoastaan hankituista resistenssigeeneistä koostuvan ResFinder-tietokannan (Zankari *et al.*, 2012, versio 26.4.2019) lisäksi työssä hyödynnettiin CARD-tietokantaa (engl. Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (Jia *et al.*, 2017, versio 25.4.2019). CARD-tietokannan pohjana toimii niin kutsutut antibioottiresistenssiontologiat (engl. Antibiotic Resistance Ontology, ARO), jotka sisältävät tietoa kustakin antibioottimolekyylistä, sen kohteista, resistenssimekanismista sekä resistenssiin liitetystä mutaatiosta. Antibioottiresistenssiontologiat käsittävät lisäksi aminohapposekvensseihin perustuvan havainnointimallin (engl. detection model), joka jakautuu edelleen proteiinihomologimalliin, proteiinivarianttimalliin sekä proteiinin ”knockout” -malleihin. Havainnointimalleja voidaan hyödyntää tutkimuksen kohteena olevien proteiinien mahdollisten mutaatioiden tunnistamisessa, ja näiden merkityksen arvioimisessa antibioottiresistenssin kannalta.

Liikkuvien geneettisten elementtien etsimisessä hyödynnettiin insertio-, integriini-, transposoni- ja plasmidisekvensseistä koostettua Mobile Genetic Element Database- eli lyhyesti MGE-tietokantaa (Pärnänen, 2018, versio 1.1). Tietokanta on koostettu yli 2000 ainutkertaisesta sekvenssistä, ja perustuu 99 %:n samankaltaisuuteen. Plasmideita seulottiin lisäksi PlasmidFinder-tietokannan (Carattoli *et al.*, 2014, versio 20.11.2018) avulla.

Isolaattien genotyyppissä havaittavien virulenssiominaisuuksien vertailussa käytettiin Virulence Factor Data Base eli VFDB -tietokantaa (Chen *et al.*, 2005, versio 31.5.2019). Lisäksi *E. coli* -isolaatti (näyte Mali\_1) serotyypitettiin *in silico*, SerotypeFinder -verkkoselaintyökalun avulla (Joensen *et al.* 2015, versio 2.0).

Kaikissa funktioiden annotoinneissa käytettiin BLAST-optioita ”-max\_target\_seqs 1”, ja ”-perc\_identity 90”. Ensin mainittu rajasi BLAST-osumat niin, että vain paras kohdesekvenssiä vastaava tietokannan osuma ilmoitettiin. Jälkimmäisen mukaan kaikki tietokannan sekvenssien kanssa yli 90 %:n samankaltaisuuden jakaneet sekvenssit määritettiin osumiksi. Näiden lisäksi kaikkien paitsi PlasmidFinder-tietokannan yhteydessä käytettiin lisäksi määrettä ”-qcov\_hsp\_perc 80”, mikä määrää osuuden eli tässä  $> 80\%$ , jolla tietokannan vastaava sekvenssi kattaa kohdesekvenssin samankaltaisuudellaan.

#### 12.7.4. Genomien visualisointi Anvi'o-ohjelmalla

Yksittäisten genomien visualisoinnissa sovellettiin Anvi'o-ohjelman pääosin metagenomiikkadatan eli jossakin ympäristössä esiintyvän mikrobiyhteisöjen genomiikan tutkimiseen laadittua protokollaa (Eren *et al.*, 2015). Anvi'o-ohjelmassa visualisointi perustuu enintään 20 000 emäksen pituisten, niin kutsuttujen splittien tuottamaan resoluutioon. Näiden splittien sisällä kontigit noudattavat Euclidean-etiäisyyteen perustuvaa järjestystä (Eren *et al.*, 2015).

Tässä työssä protokollan mukainen profiilitietokanta valmistettiin geneettisellä kartoituksella siten, että alkuperäiset lukusekvenssit rinnastettiin koottua genomia vasten. Tämän työn yksittäisten genomien tapauksessa protokollasta poikettiin jättämällä pois eri metagenominäytteille tarkoitettu näytteiden yhdistämisvaihe (komento ”anvi-merge”).

Kontigitietokanta muodostettiin vain yli 1000 nukleotidin kokoisista kontigeista. Genomin visualisointia varten muodostettuun kontigitietokantaan vietiin tietoa muun muassa näytteen taksonomiasta, proteiineja koodaavista geeneistä sekä näiden funktionaalisista annotaatioista. Nämä annotoinnit oli tehtävä splittien sekvenssejä vasten. Koska jako splitteihin johti jossain tapauksissa geenejä koodaavien sekvenssien pirstaloitumiseen niin, ettei niitä ei voitu enää havaita, Anvi'o-ohjelmaa käytettiin työssä pääasiassa visualisointitarkoituksiin. Lisäksi ohjelman salliessa ainoastaan yhden osuman osoittamisen visualisoinnissa kutakin splittiä kohden, monissa tapauksissa usean eri resistenssigeenien sijaitessa samassa splitissä, oli niiden samanaikainen visualisoiminen mahdotonta. Näiden syiden vuoksi esimerkiksi työn tilastollisissa analyyseissä käytettiin BLAST-tuloksia resistenssi- ja virulenssigeenien ja liikkuvien geneettisten elementtien esiintymisestä ennen niiden vientiä Anvi'o-kontigitietokantaan. Anvi'o -ohjelman interaktiivista käyttöliittymää hyödynnettiin kuitenkin antibioottiresistenssigeenien ja näiden geneettisten ympäristöjen tarkempaan tarkasteluun yksi splitti kerrallaan.

#### 12.7.5. Yksittäisten *K. pneumoniae* ja *E.coli* -isolaattien virulenssigeeniprofiilien vertailut

Tässä työssä sekvensoitujen kahden *K. pneumoniae* -isolaatin (näytteet Burkina\_1, Burkina\_2) kantamia virulenssigeenejä verrattiin tietokannasta haettujen 12 *K. pneumoniae* -genomin vastaaviin geenien läsnäoloa tai poissaoloa kuvaavan lämpökartan (engl. heatmap) avulla. Samoja genomeita hyödynnettiin virulenssigeenien vertailun lisäksi seuraavassa luvussa kuvatussa *K. pneumoniae* -pangenomin muodostamisessa. Näiden verrokkigenomien tiedot on esitetty liitteessä 5. Analyysiin valittiin ainoastaan yli 100-kertaisen sekvensointisyvyyden ylittäviä genomeita. Lisäksi kaikkien valittujen genomien sekvensointi oli tehty Illumina -tekniikalla. Myös genomeita, joiden yhteydessä oli julkaistu tieteellinen artikkeli, priorisoitiin, jotta näytteen alkuperä tai muita yksityiskohtia voitiin tarvittaessa tarkistaa. Noudattamalla näitä sekvenssin laatuun liittyviä kriteereitä, valikoidut näytteet edustivat suurelta osin klinisiä, sairaalapotilaista eristettyjä monilääkeresistenttejä patogeenisiä *K. pneumoniae* -bakteereita. Yhden isolaateista (GCA\_002163895) oli raportoitu olevan hypervirulentti kanta (Wang *et al.*, 2018). Näytetyypeiltään kaikki genomit yhtä jätevesiperäistä näytettä (GCA\_003584585) (Sekizuka *et al.*, 2018) lukuun ottamatta edustivat erilaisia ihmisperäisiä eritteitä. Maantieteelliseltä alkuperältään näytteet edustivat eri maanosia, Euroopasta Aasiaan ja Pohjois-Amerikasta Afrikkaan. Tulokset VFDB-tietokantaa vasten tehdystä BLAST-hausta visualisoitiin gplots-paketin (Warnes *et al.* 2016, versio 3.0.1.1) ”heatmap.2” -toiminnolla. Genomit järjestettiin suhteessa toisiinsa virulenssigeeniprofiiliensa mukaisen Jaccardin etäisyyden perusteella.

*E. coli* -isolaatin (näyte Mali\_1) virulenssigeeniprofiilia puolestaan verrattiin eri *E. coli* -patotyyppejä edustavien kantoihin virulenssiprofiileihin. Yhteensä 38:sta *E. coli* -genomista koottu taulukko genomien virulenssigeeniprofiileista on saatavilla VFDB-tietokannan verkkosivuilla osoitteesta (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/compvfs.cgi?Genus=Escherichia>, versio 25.9.2019) Aineistossa kutakin *E. coli* -patotyyppiä edusti useampi eri genomi. Tässä aineistossa ei-patogeenista kantaa edusti *E. coli* str. K-12 substr. MG1655. Virulenssigeenien vertailua varten aineistosta muodostettiin yhdessä Mali\_1-isolaatin virulenssigeeniprofiilin kanssa läsnäolo-poissaolomatriisi, joka visualisoitiin lämpökartan avulla kuten edellä. Profiilien samankaltaisuutta toisiinsa nähden esitettiin perustuen Jaccard-etäisyyksiin.

#### 12.8. *Klebsiella pneumoniae* -pangenomin muodostus

Yhdistämällä useiden saman lajin eri kantojen geenitieto, pangenomianalyysin avulla voidaan muun muassa selvittää horisontaalisen geeninsiirron evolutionaarinen vaikutus kyseisen lajin kehittymisen kannalta. *Klebsiella pneumoniae* -pangenomi muodostettiin 12:sta NCBI:n avoimesta tietokannasta ladatusta *Klebsiella pneumoniae*- tai *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* -kokogenomisekvenssistä tässä työssä sekvensoitujen näytteiden Burkina\_1 ja Burkina\_2 lisäksi.

Genomit ladattiin NCBI:n (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) FTP-serveriltä ja ennen pangenomin muodostamista ne sekvenssityypitettiin MLST-komentorivityökalulla pubMLST-tietokantaa vasten (Larsen *et al.*, 2012). Pangenomianalyysissä noudatettiin Anvi'o -alustan pangenomeille laaditun protokollan (Delmont, & Eren, 2018) mukaisia komentoja (Liite 4). Funktionaalinen annotaatio antibioottiresistenssigeenien, virulenssigeenien, liikkuvien geneettisten elementtien sekä plasmidien suhteen tehtiin kuten yksittäisten genomien kohdalla edellä.

## 12.9. Pangenomianalyysi ja tilastolliset menetelmät

Anvi'o-ohjelman interaktiivisen käyttöliittymän avulla pangenomi voitiin jakaa ydin- ja uniikkigenomiin sekä vaihtelevaan alueeseen (engl. core, unique ja variable genome) sen perusteella esiintyvätkö geeniklusterit kaikissa pangenomin genomeissa, vain yhdessä vai useammassa kuin yhdessä, mutta ei kaikissa genomeissa. Eri funktioiden osuutta kussakin näissä pangenomin osassa selvitettiin BLAST-hauilla pangenomista tuotuja sekvenssejä vasten (komento "anvi-get-sequences-for-gene-clusters").

Pangenomin sisältämä tieto 14:ssä *K. pneumoniae* -genomessa esiintyvistä funktionaalisista annotaatioista kerättiin tilastollisia analyyskejä varten (komento "anvi-summarize"). Genomien sekvenssi-identiteetteihin perustuvaa samankaltaisuutta (engl. average nucleotide identity, ANI) tutkittiin luomalla genomien välisiä suhteita kuvaava samankaltaisuuspuu. Tämä dendrogrammi muodostettiin Anvi'o-ohjelmalla lasketun (komento "anvi-compute-ani") Euclidean-etäisyysmatriisin perusteella. Kaikki työn tilastolliset analyysit ajettiin R-Studioissa (RStudio Team, 2016) ja analyyseissä käytetyt komennot on esitetty liitteessä 6.

Korrelaatio eri tietokantojen (ResFinder, CARD, VFDB ja MGE) tuottamien BLAST-osumien lukumäärien suhteen visualisoitiin ggplot2 R-paketin avulla (Wickham, 2016, versio 3.2.1).

Antibioottoresistenssigeenien ja toisaalta virulenssigeenien liikkuvuuspotentiaalia tutkittiin edelleen selvittämällä näiden geenien yhteyttä liikkuviin geneettisiin elementteihin. Eri genomien uniikkeja resistenssigeeni- ja virulenssigeeniprofiileja sekä liikkuvien geneettisten elementtien muodostamia profiileja verrattiin toisiinsa Mantelin testin avulla. Ennen testiä kutakin funktiota (antibiootiresistenssigeenit; ResFinder; liikkuvat geneettiset elementit: MGE; virulenssigeenit: VFDB) vastaavista geeneistä oli muodostettu läsnäolo-poissaolo-matriisit. Matriisit muutettiin vegan-paketin (Oksanen *et al.* 2019, versio 2.5-6) ”vegdist” -komennon avulla noudattamaan Jaccard-etäisyyttä.

## 13. Tulokset

### 13.1. *K. pneumoniae* ja *E. coli* -kantojen eristys kasvatusmenetelmin

Työssä käytetty kaksivaiheinen kasvatus osoittautui tehokkaaksi menetelmäksi *K. pneumoniae*- ja *E. coli* -kantojen valikoimiseen ulostenäytteistä. SCAI-kasvatusmaljalla oli mahdollista erottaa visuaalisesti suuret, keltaiset *Klebsiella* spp.-pesäkkeet pienistä, vain yhtä kahdesta hiilenlähteestä hyödyntävistä *E. coli* -pesäkkeistä. Työn aiheen ja tavoitteiden mukaisesti myös *E. coli* -pesäkkeitä muistuttavat isolaatit otettiin mukaan jatkotutkimuksiin.

Kaikista 58 isolaatista 30 tunnistettiin MALDI-TOF MS -määrityksen korkeimmalla luotettavuustasolla, mikä tarkoitti hyvin todennäköistä lajitason tunnistusta (Taulukko 3). Varmalla sukutason, mutta vain todennäköisellä lajitason tunnistuksella tunnistettiin 26 isolaattia. Kolme isolaattia tunnistettiin varmaa sukutason tunnistusta vastaavalla tasolla. Yhtään näytettä ei tunnistettu epäluotettavaa tunnistusta vastaavilla vastaavuuspisteillä. Kokogenomisekvensointiin valitut isolaatit, Burkina\_1, Burkina\_2, Burkina\_3 sekä Mali\_1 on merkitty taulukkoon 3 punaisella värillä.

Yhteensä 55:sta valikoidusta isolaatista 40 edusti lajia *K. pneumoniae* hyvin todennäköisen tai todennäköisen lajitason tunnistuksen perusteella yhtä isolaattia lukuunottamatta. Myös muista eristetyistä bakteereista kaikki yhtä lukuun ottamatta edustivat *Enterobacteriaceae*-bakteeriheimoa. Lajit tunnistettiin pääosin korkean luotettavuuden tasolla.

Valtaosa (17/21) Burkina Fasossa asuvan kolmen ihmisen ulostenäytteistä eristetyistä isolaateista edusti *Klebsiella pneumoniae* -lajia. Muut isolaatit olivat *Enterobacter cloacae* (2), *Escherichia coli* (1) ja *Klebsiella variicola* (1). Kolmesta burkinafasolaisesta kohteesta kerätyistä jätevesinäytteistä

onnistuttiin eristämään *K. pneumoniae* -kantoja niin ikään suuressa suhteessa (16/21). Kaksi isolaateista edustivat lajia *Citrobacter freundii*. Lisäksi tunnistettiin yksi *Stenotrophomonas maltophilia* ja yksi *Serratia marcescens*.

Noin puolet (6/13) kaikista Malista kerätyistä ulostenäytteistä kasvatetuista isolaateista osoittautui *K. pneumoniae* -lajin edustajiksi. Muita lajeja olivat *K. variicola* (2), *Escherichia coli* (2), *Enterobacter cloacae* (2) sekä *Salmonella* spp. (1).

**Taulukko 3: Lajinmääritys MALDI-TOF MS -menetelmällä.** Kaikki tutkitut isolaatit tunnistettiin pääosin korkean luotettavuuden tasolla. Laitevalmistajan asettamien tunnistusluotettavuutta arvioivien vastaavuuspisteiden (engl. score values) raja-arvot niin kutsutulle hyvin todennäköiselle lajitason tunnistukselle ovat 2,300–3,000 (kuvassa tumman vihreä). Varman sukutason, mutta vain todennäköisen lajitunnistuksen vastaavat raja-arvot ovat 2,000–2,299 (kuvassa vaaleanvihreä) ja ainoastaan epätodennäköistä sukutason tunnistusta kuvaavat pisteet välillä 1,700–1,999 (kuvassa keltainen) (Carbounelle *et al.*, 2010). Kokogenomisekvensointiin valitut isolaatit on korostettu lihavoidulla tekstillä (Burkina\_1 eli isolaatti BF17C-2; Burkina\_2 eli isolaatti BF19A-2; Burkina\_3 eli isolaatti BF12-C2; Mali\_1 eli isolaatti M12C-3).

Kanta / näyte	Isolaatti	Laji	Vastaavuuspisteet
DSM 1103 (ATCC 25922)	"V"	<i>Escherichia coli</i>	2,32
DSM 1103 (ATCC 25922)	"L"	<i>Escherichia coli</i>	2,37
DSM 26371 (ATCC 700603)	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,43
BF17A	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,18
	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,75
BF17B	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,24
	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,20
	3	<i>Escherichia coli</i>	2,12
BF17C (Burkina 1)	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,11
	2	<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	<b>2,28</b>
	3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,14
BF18A	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,31
	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,23
BF18B	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,33
	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,19
BF18C	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,17
	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,30
BF19A (Burkina 2)	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,10
	2	<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	<b>2,14</b>
BF19B	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,18
	2	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,02
BF19C	1	<i>Klebsiella variicola</i>	1,86
	2	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,98
	3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,15

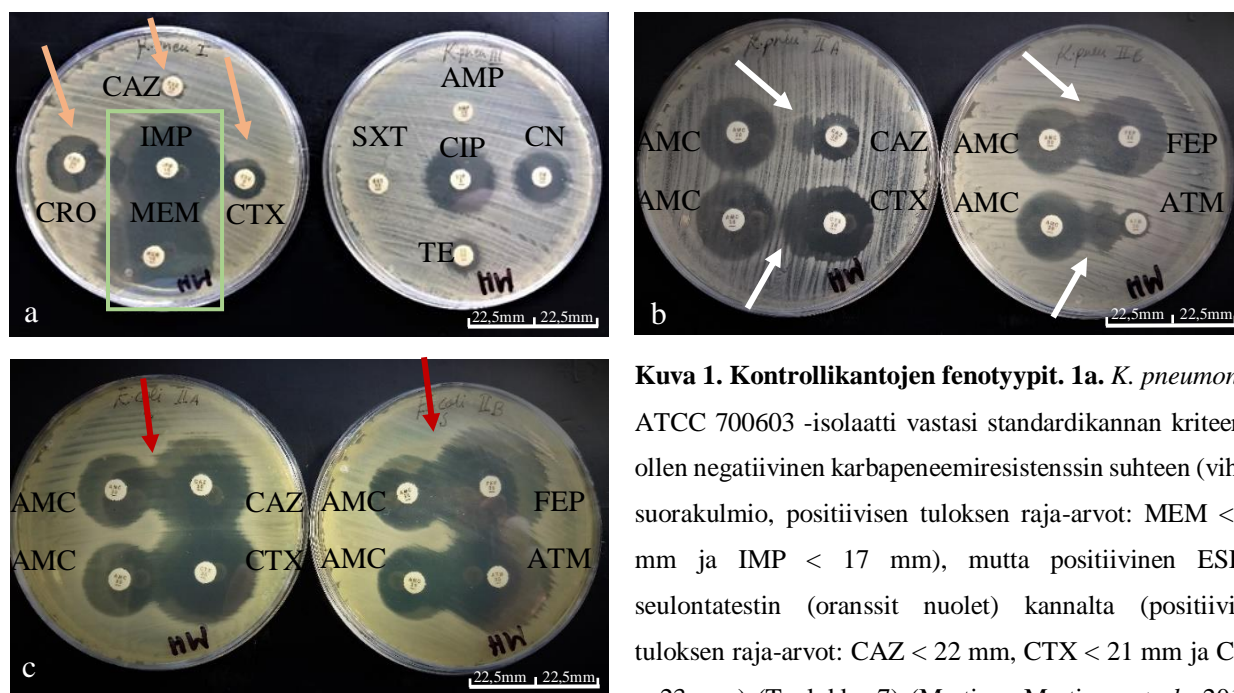
BF12A	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,32
	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,37
BF12B	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,41
BF12C (Burkina 3)	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,32
	2	<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	<b>2,32</b>
BF13A	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,31
	2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2,35
	3	<i>Serratia marcescens</i>	2,12
BF13B	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,33
	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,41
	3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,41
BF13C	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,52
	2	<i>Citrobacter freundii</i>	2,18
	3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,45
BF15A	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,47
	2	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,20
BF15B	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,36
	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,11
BF15C	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,34
	2	<i>Citrobacter freundii</i>	2,27
	3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,49
M12A	1	<i>Klebsiella variicola</i>	2,36
	2	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,18
	3	<i>Klebsiella variicola</i>	2,41
	4	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,28
M12B	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,24
	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,32
	3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,29
M12C (Mali 1)	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,46
	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,41
	3	<b><i>Escherichia coli</i></b>	<b>2,40</b>
M12D	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,08
	2	<i>Salmonella</i> sp.	2,36
	4	<i>Escherichia coli</i>	2,42

### 13.2. Fenotypitysmenetelmän standardointi

Eristetyt isolaatit tutkittiin näiden fenotyypissä ilmenevän resistenssin osalta kiekkoherkkyysmäärittelyn avulla. Testimenetelmän toimivuuden varmistamiseen käytettiin kontrollikantoja. Odotetusti kontrollikanta *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 antoi negatiivisen tuloksen karbapenemaasituotannon (Kuva 1a) ja positiivisen tuloksen ESBL-tuotannon suhteen



(Kuva 1b) EUCAST:n näiden resistenssifenotyyppien seulontaan ja varmistamiseen määrittämien raja-arvojen mukaisesti (Martinez-Martinez *et al.*, 2017). Lisäksi kanta oli resistentti ampisilliinille ja tetrasykliinille. Myös vastustuskyky sulfa-trimetopriimi-yhdistelmäantibioottia kohtaan havaittiin, mikä ei ollut linjassa kyseisen kontrollikannan aiemmin ilmoitetun fenotyypin kanssa (Rasheed, *et al.*, 2000) (Kuva 1b). Kontrollikanta *E. coli* ATCC 25922 oli negatiivinen niin karbapeneemiresistenssin, ESBL-testin, kuin kaikkien muidenkin testattujen antibioottien suhteen. (Kuva 1c.)



**Kuva 1. Kontrollikantojen fenotyypit. 1a.** *K. pneumoniae* ATCC 700603 -isolaatti vastasi standardikannan kriteerejä ollen negatiivinen karbapeneemiresistenssin suhteen (vihreä suorakulmio, positiivisen tuloksen raja-arvot: MEM < 28 mm ja IMP < 17 mm), mutta positiivinen ESBL-seulontatestin (oranssit nuolet) kannalta (positiivisen tuloksen raja-arvot: CAZ < 22 mm, CTX < 21 mm ja CRO < 23 mm) (Taulukko 7) (Martinez-Martinez *et al.*, 2017).

Lisäksi resistenssit ampisilliinille (AMP), tetrasykliinille (TE) sekä sulfa-trimetopriimi-yhdistelmäantibiootille (SXT) voitiin havaita (oikeanpuoleinen kasvatusmalja) (Taulukko 7). **1b.** ESBL-fenotyyppi voitiin varmistaa kaksoiskiekkotestissä havaitulla ellipsinmuotoisella niin kutsutulla ”haamuestokuvioilla” (valkoiset nuolet) amoksisilliini-klavulaanihappo-yhdistelmäkiekon (AMC) ja vaihtuvan kefalosporiinin (CAZ, CTX, FEP) tai monobaktaamin (ATM) välillä (Taulukko 7). **1c.** Negatiivisen kontrollikannan *E. coli* ATCC 25922 tapauksessa ESBL-tuotannon varmistavia haamuestokuvioita ei muodostunut (punaiset nuolet) (Taulukko 7).

ESBL-fenotyyppiensä puolesta kontrollikantojen resistenssiprofiilit vastasivat odotettuja ilmiä, joten tällä tavoin suoritettujen antibioottiresistenssin fenotyyppisen määrittämisen voitiin olettaa tuottavan luotettavia tuloksia. Kaikki fenotyyppitysten tulokset on esitetty liitteessä 7. Kvantitatiivisen tiedon sijaan työssä keskityttiin ainoastaan kuvailevan tiedon tuottamiseen muun muassa siksi, että pelkän fenotyypin perusteella ei tämän Pro gradu -työn rajoissa ollut mahdollista varmistaa samasta näytteestä olevien isolaattien edustavan eri bakteerikantoja.



### 13.3. Resistenssifenotyypit nanorolaisista ulostenäytteistä eristetyissä isolaateissa

Lapsen ulostenäytteestä eristetyt seitsemän *K. pneumoniae* -kanta ja yksi *E. coli* -kanta (BF17A-C) olivat fenotyyppiltään ESBL-positiivisia (Taulukko 1; Taulukko 3). Vertailemalla kantojen muita resistenssiominaisuuksia, vähintään kaksi erilaista ESBL-positiivista *K. pneumoniae* -isolaattia voitiin erottaa. Toinen näistä osoitti beetalaktamaasi-inhibiittoriresistenssiin viittaavaa fenotyyppiä. Tämä isolaatti (Burkina\_1) valittiin kokogenomisekvensointiin. Kaikki lapsen ulostenäytteestä eristetyt isolaatit olivat vastustuskykyisiä ampisilliinille ja kaikki *K. pneumoniae* -isolaatit näiden lisäksi myös sulfa-trimetopriimille (Liite 7).

Aikuisen ulostenäytteestä eristetyt kannat olivat ESBL-negatiivisia *K. pneumoniae* -isolaatteja (BF18A-C). Ampisilliiniresistenssin lisäksi kaksi kuudesta isolaatista osoitti vastustuskykyä siprofloksasiinia kohtaan.

Toisen aikuisen ulostenäytteestä eristetyt bakteerit (BF19A-C) osoittivat suurinta vaihtelevuutta niin lajiensa kuin resistenssiprofiiliensa puolesta. Kaikki kolme *K. pneumoniae* -isolaattia olivat fenotyyppiseltä resistenssiprofiililtaan erilaisia. Yhtäkään ESBL-positiivista kantaa ei eristetty. Kuitenkin eri isolaateissa, eri yhdistelminä vastustuskykyä esiintyi ampisilliini-, gentamysiini-, siprofloksasiini-, sulfa-trimetopriimi- sekä tetrasykliiniantibiootteja kohtaan. Yksi näistä *K. pneumoniae* -isolaateista valittiin kokogenomisekvensointiin (Burkina\_2).

### 13.4. Resistenssifenotyypit Ouagadougossa kerätyistä jätevesinäytteistä eristetyissä isolaateissa

Kaikki viidestä tutkitusta Ouagadougossa sijaitsevan Yalgadon sairaalan jätevesinäytteistä eristetyistä *K. pneumoniae* -isolaatista olivat ESBL-positiivisia (BF12A-C). Lisäksi kaikki paitsi yksi näistä isolaateista oli vastustuskykyinen kaikille testatuille antibiooteille karbapeneemeja lukuun ottamatta, minkä perusteella vähintään kaksi eri ESBL-kantaa voitiin erottaa. Yksi näistä valittiin kokogenomisekvensointiin (Burkina\_3).

Eri jätevesien risteymäkohdasta peräisin olevasta näytteestä eristettiin useita eri bakteerilajien edustajia (BF13A-C). Näistä voitiin erottaa yksi ESBL-positiivinen sekä vähintään kolme erilaista ESBL-negatiivista *K. pneumoniae* -kanta. Työssä eristetyistä kannoista ainoana *Enterobacteriaceae*-bakteeriheimoon kuulumattomana lajina havaittiin *Stenotrophomonas maltophilia* -bakteeri. Kyseinen kanta osoittautui karbapeneemiresistentiksi sekä ESBL-

positiiviseksi. Lisäksi kaikista testatuista antibiooteista kanta osoitti herkkyyttä ainoastaan meropeneemia sekä sulfa-trimetopriimia kohtaan. Tämä äärimmäisen resistentti fenotyyppi on *S. maltophilia* -lajityypillinen ominaisuus eikä hankitun resistenssin seurausta (Denton ja Kerr 1998). Lisäksi lajin herkkyyden määrittämiseen kiekkotestien avulla liittyy tulosten vaihtelevuudesta johtuen paljon epävarmuutta, minkä vuoksi niiden kliinistä käyttöä muiden kuin sulfa-trimetopriimin kohdalla ei suositella (EUCAST 2019d). Jätevesinäytteestä eristetyt *Serratia marcescens*- sekä *Citrobacter freundii* -isolaatit olivat resistenttejä ainoastaan ampisilliinille.

Teurastamon esikäsittelyn läpikäyneestä jätevedestä eristetyt *K. pneumoniae* -lajin isolaatit ilmensivät resistenssiä ainoastaan ampisilliiniä kohtaan (BF15A-C). *Citrobacter freundii* -isolaatti oli lisäksi vastustuskykyinen siprofloksasiinille.

### 13.5. Resistenssifenotyypit bamakolaisista ulostenäytteistä eristetyissä isolaateissa

Yhtäkään ESBL-positiivista *Klebsiella pneumoniae* -lajin edustajaa ei löydetty lasten ulostenäytteistä Malin Yirimadjon terveyskeskuksessa eristetyistä kannoista. Kahden sekaruokinnassa olleen lapsen ulostenäytteistä eristetyt *K. pneumoniae*-, *K. variicola*-, ja *Enterobacter cloacae* -isolaatit olivat vastustuskykyisiä ainoastaan ampisilliinille (M12A ja M12B).

Rintamaitoruokinnassa olleista lapsista ensimmäisen ulosteperäinen *E. coli* -isolaatti oli ESBL-positiivinen ja lisäksi vastustuskykyinen tetrasykliinille, siprofloksasiinille, gentamysiinille sekä sulfa-trimetopriimille (M12C). Tämä isolaatti valittiin kokogenomisekvensointiin (Mali\_1). Toisen lapsen ulostenäytteestä eristettiin ampisilliinille, gentamysiinille, tetrasykliinille sekä sulfa-trimetopriimille resistentti *K. pneumoniae* -kanta. Lisäksi näytteestä eristettiin ampisilliinia, sulfa-trimetopriimiä ja tetrasykliiniä kohtaan vastustuskykyinen *Salmonella* spp. -bakteeri.

Kaikki eri näytteistä eristetyt, todennäköisesti eri isolaatteja edustaneet ESBL-positiiviset sekä muutoin resistenssiprofiilinsa puolesta kiinnostavimmat isolaatit on esitetty taulukossa 4 EUCAST:n asiantuntijasääntöjen ohjeiden (EUCAST 2019c) mukaisesti. Näiden joukosta neljä isolaattia valittiin kokogenomisekvensointiin genotyyppisen resistenssiprofiilin selvittämiseksi.

**Taulukko 4. Resistenssifenotyypin perusteella kiinnostavimmat isolaatit.** EUCAST:n asiantuntijasääntöjen (EUCAST 2019c) mukaisesti ampisilliinille resistentit *Klebsiella* spp.- sekä *E. coli* -kannat on raportoitava lisäksi resistenteiksi piperasilliinille myös ilman testausta. Vastustuskyky siprofloksasiinille *Enterobacteriales*-lahkon bakteerien yhteydessä raportoidaan vastustuskykynä kaikkia fluorokinoloneja kohtaan. Asiantuntijaohjeet *Enterobacteriales*-bakteerien aminoglykosidiresistenssin tulkinnaksi ovat paraikaa kehitteillä tulosten tarkoituksenmukaisemman ja paremmin todellisuutta vastaavan raportoinnin saavuttamiseksi.

Kokogenomisekvensointiin valikoidut kannat on merkitty sinisellä värillä ja niitä vastaavilla nimillä Burkina\_1, Burkina\_2, Burkina\_3 ja Mali\_1. Katso isolaattien alkuperää ja lajinmääritystä koskevat taulukot 1 ja 3.

Laji	ESBL-tuotto	Ampisilliini	Piperasilliini	Sulfa-trimetopriimi	Tetrasykliini	Gentamysiini	Fluorokinolonit	Imipeneemi	Isolaatti	Vastaava nimi
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	BF17C-2	
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	BF17C-2	Burkina_1
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	BF17C-2	
<i>K. pneumoniae</i>	-	+	+	+	+	-	+	-	BF19A-2	Burkina_2
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	BF12C-3	Burkina_3
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	BF12A-1	
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	BF13A-1	
<i>S. maltophilia</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	BF13A-2	
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	M12C-3	Mali_1

### 13.6. Kokogenomisekvensointi ja genomien kokoaminen

Valittujen monilääkeresistenssiä ja kolmen isolaatin kohdalla lisäksi ESBL:n tuottoa fenotyypissään ilmentävien kantojen resistenssi- ja virulenssiominaisuuksia tutkittiin seuraavaksi geenitasolla. Tämä edellytti sekvenssoinnin tuottamien lukusekvenssien kokoamista hahmotelmagenomeiksi.

Sekvensointi ja genomien kokoaminen tuotti laadukkaat tai kohtalaisen laadukkaat hahmotelmagenomit näytteiden Burkina\_1, Burkina\_2 ja Mali\_1 kohdalla (Taulukko 5). Tämä voitiin tulkita muun muassa kontigien alhaisen lukumäärän, mutta niiden suuren keskimääräisen koon perusteella. Sen sijaan, näytteen Burkina\_3 kohdalla koonnin alhainen peittävyys sekä kontigien lyhyys, ja näin ollen genomien pirstaloituminen lukusiin pieniin kontigeihin, viittasi genomien heikkoon laatuun. Myös N50-luku sekä Mali\_1- että Burkina\_3-näytteissä, mutta etenkin jälkimmäisen kohdalla oli hyvin alhainen. Luku kuvaa kontigipituutta, jonka koko genomien kontigeista 50 % ylittää (Mäkinen *et al.*, 2012). Lisäksi Burkina\_3-näytteen genomikoko poikkesi *K. pneumoniae* -lajille tyypillisestä noin 5,3 kb:n kokoisesta genomista muita näytteitä selkeästi enemmän. Nämä huomiot antoivat syyn epäillä sekvenssoinnissa käytetyn DNA-näytteen puhtautta. Kontaminaatio näytteen Burkina\_3 genomien heikkoa laatua selittävänä tekijänä vahvistui genotyyppisen ja fenotyyppisen resistenssi-profiilin vertailussa. Tästä johtuen kyseistä genomisekvenssiä ei analysoitu pidemmälle.

**Taulukko 5. Koottujen genomien tiedot.** Taulukkoon on kerätty hahmotelmagenomin laatua kuvaavia parametrejä, kuten koonnin peittävyyttä, kokoa sekä GC-emäspitoisuutta. Kontigien lukumäärää (lkm) sekä emäspareihin perustuvaa kokoa on kuvattu suurimman kontigin sekä keskimääräisen kontigipituuden avulla (N50-parametri).

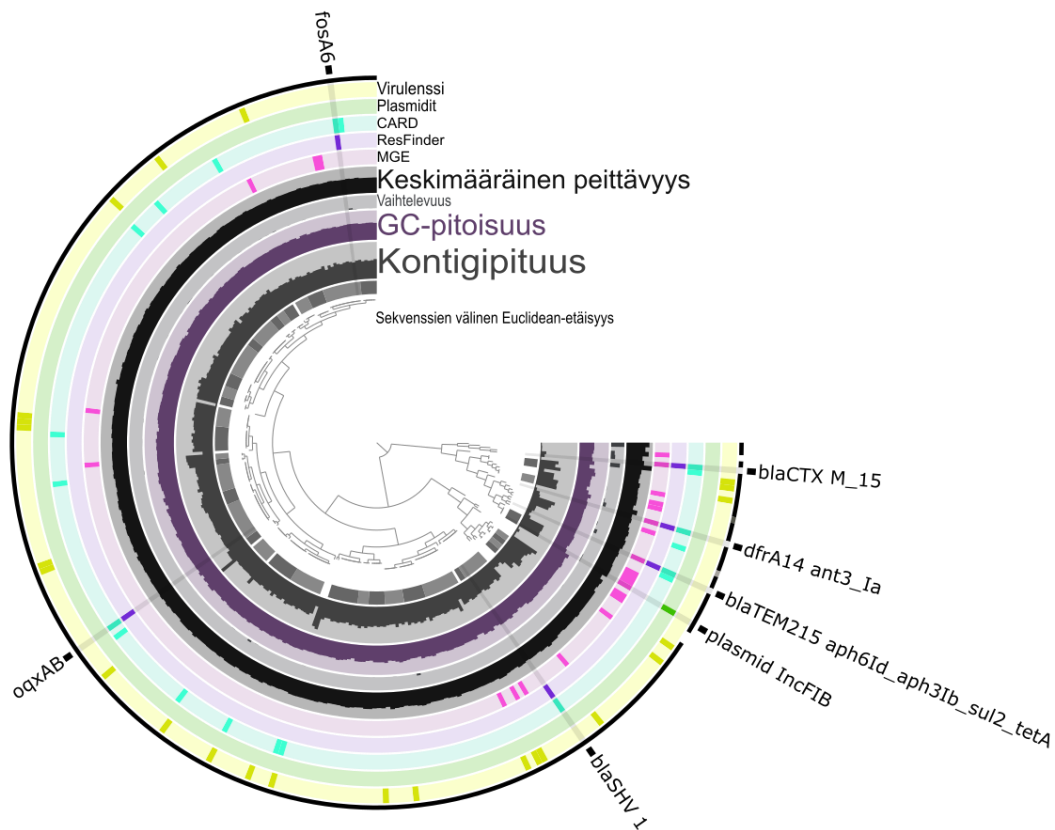
Isolaatti	Koonnin peittävyys	Kontigit (lkm)	Suurin kontigi (bp)	Kokonaispituus (bp)	N50	GC %
Burkina_1	38,2 x	91	289 546	5 618 152	159 988	57.21
Burkina_2	63,8 x	138	358 628	5 148 226	93 286	57.9
Burkina_3	26,3 x	2179	10 346	4 227 434	2 522	58.06
Mali_1	54,8 x	488	84 227	5 232 969	23 080	50.74

### 13.7. Kokogenomisekvenssien analysointi

Kokogenomisekvenssianalyysin avulla työssä tutkittiin isolaattien Burkina\_1, Burkina\_2 ja Mali\_1 genotyyppissä havaittavaa resistenssiprofilia ja virulenssiominaisuuksia sekä näiden yhteyksiä liikkuviin geneettisiin elementteihin. Genomien visualisoinnin myötä voitiin tarkastella resistenssi- ja virulenssigeenien sekä liikkuvien geneettisten elementtien jakaantumista eri splittien eli noin 20 000 emäksestä muodostuvien yhteneväisten sekvenssialueiden kesken sekä niiden sisällä. Kaikissa kolmessa näytteessä (Burkina\_1, Burkina\_2, Mali\_1) havaitut resistenssigeenit sekä näitä vastaavat fenotyypit on koottu liitteeseen 8. Lisäksi sekvenssianalyysin myötä multilokussekvenssityypityksen (engl. MLST) avulla myös genomien sekvenssityypit voitiin selvittää. Tämä *in silico* MLST-menetelmä perustuu perusaineenvaihduntageenien (engl. house keeping genes) eri alleelien vertailuun. Tietoa genomien sekvenssityypeistä voitiin hyödyntää muun muassa vertailuun suhteessa aiemmin kuvattujen, saman sekvenssityypin kantoihin.

#### 13.7.1. Burkinafasolaisen lapsen ulostenäytteestä eristetty *K. pneumoniae* (isolaatti Burkina\_1)

Burkina\_1-isolaatti edusti MLST-tyyppiä 45, ja sen genomi jakautui 276:nteen splittiin (Kuva 2). Genomin spliteistä suurinta sekvenssivariaatiota (kuvassa kehä ”Vaihtelevuus”) osoittaneet splitit asettuivat alhaisimman GC-pitoisuuden alueelle, jossa myös suurin osa antibioottiresistenssigeenejä (kuvassa kehä ”ResFinder”) sekä liikkuvia geneettisiä elementtejä (kuvassa kehä ”MGE”) koodaavista spliteistä sijaitsi. Myös vaihtelevuus kontigien pituuksissa (kuvassa kehä ”Kontigipituus”) näiden splittien kesken vaikutti olevan genomin muihin splitteihin verrattuna suurempaa.



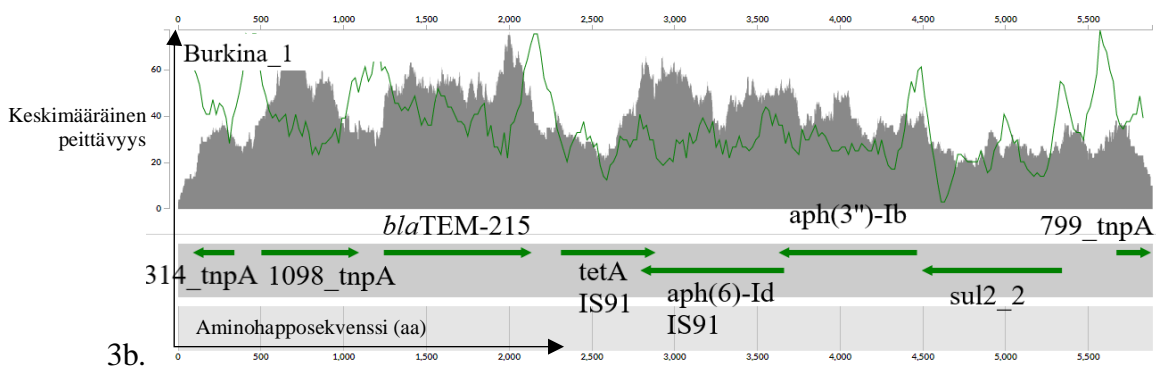
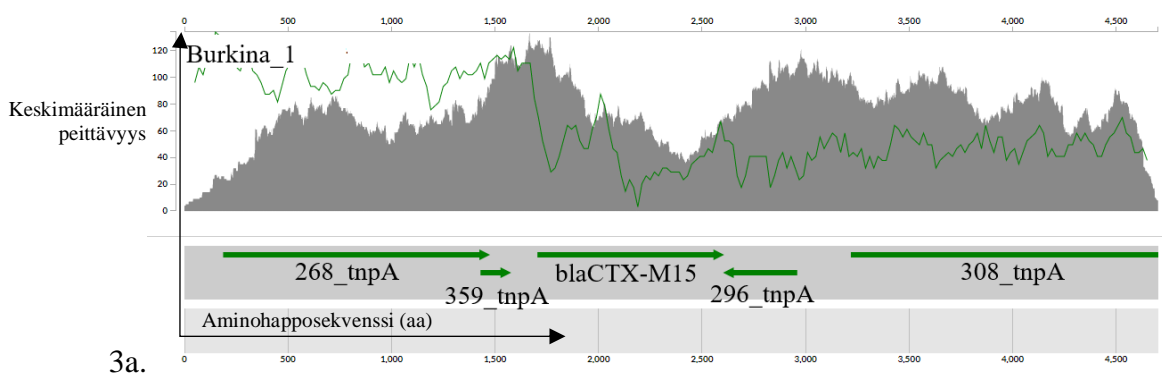
**Kuva 2: *K. pneumoniae* -isolaatin genomin kokoaminen (Burkina\_1).** Genomi on visualisoitu Anvi'o-ohjelman (Eren *et al.*, 2015) mukaisten niin kutsuttujen splittien avulla, jotka kuvaavat kukin noin 20 000 emäksen sekvenssialueita. Splitit voivat sisältää vaihtelevan määrän kontigeja, näiden pitukisista riippuen. Splitit asettuvat järjestykseen kuvan kehällä GC-pitoisuuksiensa mukaisesti. Kontigisekvenssien Euclidan-etäisyyteen perustuvaa samankaltaisuutta kuvataan sisäkehän dendrogrammin avulla ("Sekvenssien välinen Euclidean-etäisyys"). Kuvan uloimmilla kehillä, eri värein esitetyillä renkailla on esitetty liikkuvia geneettisiä elementtejä (MGE, aniliininpunainen), antibioottiresistenssigeenejä (ResFinder, sininen; CARD, turkoosi), plasmideja (Plasmidit, vihreä) sekä virulenssigeenejä (Virulenssi, keltainen) sisältävät splitit. Kukin värillinen palkki näillä kehillä tarkoittaa, että kyseinen splitti sisältää joko yhden tai useamman kyseisen funktioyhmän geenin, kuten virulenssigeenin keltaisen värin kohdalla. Lisäksi kuvan hahmottamisen helpottamiseksi resistenssigeenit (ResFinder) on merkitty tekstillä.

Burkina\_1-genomi kantoi ESBL-geeniä *CTX-M-15* sekä kapeakirjoisesti beetalaktaameja hydrolysoivia entsyymejä SHV-1 ja TEM-215 koodaavat geenit (Kuva 2). BLAST-haulla tehdyn vertailun perusteella geenivariantin *TEM-215* sekvenssi poikkesi yleisimmin tunnetusta *TEM-1B*-variantista ainoastaan kahden nukleotidin osalta. Lisäksi genomissa voitiin havaita aminoglykosidiresistenssigeenit *ant(3'')-Ia*, *aph(3'')-Ib* ja *aph(6)-Id*, fosfomysiiniresistenssigeeni *fosA\_5*, sulfonamidiresistenssiin yhdistetty *sul2\_2*-geeni sekä tetrasykliiniresistenssigeeni *tet(A)\_6* (Kuva 2). Myös erityisesti kinoloniantibioottien ulosvirtaukseen ja näin ollen alentuneeseen herkkyyteen tätä antibioottia kohtaan yhdistetyt geenit *oqxA*, *oqxB* löydettiin (Kuva 2).

Beetalaktamaasigeeni *CTX-M-15* oli linjassa näytteen Burkina\_1 fenotyypissä havaitun ESBL-positiivisuuden kanssa (Liite 8). Se ei kuitenkaan selittänyt fenotypityksessä havaittua isolaatin kykyä vastustaa beetalaktaami-beetalaktamaasi-inhibiittoriyhdistelmäantibioottia, mikä voitiin tulkita havaitsematta jääneestä haamuestokuvioista amoksisilliini-klavulaanihappoyhdistelmäkiekon ja keftatsidiimi- sekä kefotaksiimikiekkujen välillä (Liite 7b). Ilmiötä usein selittävää plasmidin koodaamaa AmpC-geeniä ei löydetty (Kuva 2; Liite 8), mikä herätti kysymyksiä kasvatusmaljalla nähtyyn fenotyyppiin johtaneista tekijöistä.

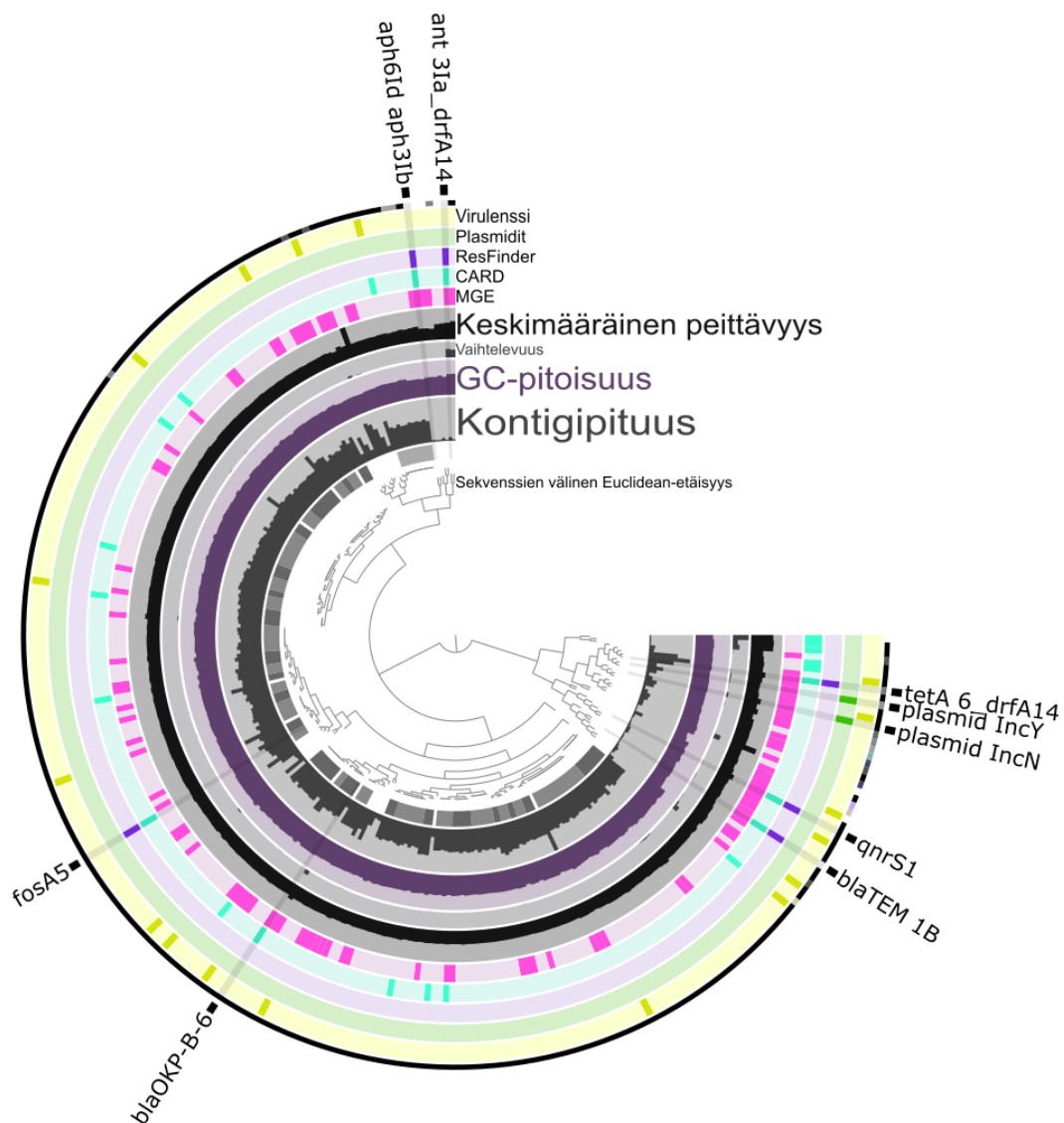
Monet näytteen resistenssigeeneistä sijaitsivat samassa splitissä lähellä toisiaan viitaten siihen että ne olivat saman plasmidin koodaamia. Replikonityypin IncFIB(K)-plasmideihin viittavia sekvenssejä voitiin tunnistaa. Esimerkiksi *CTX-M-15*-geenin havaittiin sijaitsevan lukuisten transposonisekvenssien ympäröimänä (Kuva 2; Kuva 3a). Lisäksi splitin sekvenssien NCBI-tietokantaa vasten tehdyn haun perusteella *ISEcp1*-insertiosekvenssin sijainti tällä sekvenssialueella voitiin todistaa.

Toisena esimerkkinä eri resistenssigeenien ja liikkuvien geneettisten elementtien asettumisesta hyvin lähelle toisiaan toimi splitti, jossa nämä geenit olivat edustettuina suurissa määrin sekvenssin molemmissa juosteissa (Kuva 3b). Lukuisten transposonisekvenssien lisäksi splitti sisälsi resistenssigeenit *aph(3'')-Ib*, *TEM-215* ja *sul2* sekä IS91-tyyppin insertiosekvensseissä koodatut geenit *tet(A)\_6* sekä *aph(6)-Id*.



**Kuva 3: Antibioottiresistenssigeenien geneettinen ympäristö Burkina\_1-isolaatissa.** Harmaa histogrammi kuvaa sekvenssin peittävyttä, ja vihreällä merkitty jana sekvenssin GC-pitoisuutta. Vihreät nuolet kuvan alalaidassa esittävät tunnettuja geenejä, ja tekstillä merkityt tässä työssä tarkasteltuja geenejä. Esimerkkien tavoin kuvan **3a.** splitissä voitiin nähdä transposaasisekvenssien ympäröimä *CTX-M-15*-geeni ja kuvassa **3b.** lukuisten eri resistenssigeenien välinen yhteys suhteessa toisiinsa sekä liikkuviin geneettisiin elementteihin.

### 13.7.2. Burkinafasolaisen aikuisen ulostenäytteestä eristetty *K. pneumoniae* (isolaatti Burkina\_2)



**Kuva 4: Burkinafasolaisen aikuisen ulostenäytteestä eristetyn *K. pneumoniae* -isolaatin genomien kokoaminen.** Visualisoinnista oli nähtävissä virulenssigeenien matala, ja toisaalta liikkuvien geneettisten elementtien korkea lukumäärä sekä painottuminen lyhyistä kontigeista muodostuvien splittien alueelle, missä myös GC-pitoisuus oli muuta genomia alemmalla tasolla.



Aikuisen ihmisen ulosteperäisen *K. pneumoniae* -kannan genomi jakautui 273:een splittiin (Kuva 4). Isolaatin sekvenssityyppi oli kirjallisuudelle aikaisemmin tuntematon. Liikkuvien geneettisten elementtien lukumäärä oli lapsen ulosteesta eristettyä Burkina\_1-isolaattia korkeammalla tasolla, siinä missä virulenssigeenien määrä puolestaan oli matalampi.

Genomi kantoi kapeakirjoisesti beetalaktaameja hydrolysoivia entsyymejä koodaavia geenejä *OKP-B-6* ja *TEM-1B*, mutta ei ESBL-geenejä, mikä vastasi fenotyyppityksen tuloksia. Lisäksi aminoglykosidiresistenssiin yhdistetyt geenit *ant(3'')-Ia*, *aph(3'')-Ib* sekä *aph(6)-Id* ja fosfomysiiniresistenssiin liitetty *fosA\_5*-geeni ja matalan tason siprofloksasiiniresistenssiä aiheuttava *qnrS1*-geeni voitiin havaita. Muita löydettyjä resistenssigeenejä olivat tetrasykliiniresistenssigeeni *tet(A)\_4* sekä trimetopriimi-resistenssigeeni *dfrA14*.

Yksittäisten resistenssigeenien lisäksi isolaatin genomissa havaittiin AcrAB-TolC-effluksipumpun ylituotantoon yhdistettyjä pistemutaatiota (Kuva 5). Siinä missä CARD:n laatiman proteiinivarianttimallin mukaan kolmesta vähintään yksi kolmesta määritetyistä aminohappovaihdoksista vaaditaan todistamaan mutaatio merkittäväksi resistenssin kannalta, Burkina\_2-isolaatin kohdalla näistä havaittiin kaksi. Aminohappovaihdoksista M109I, Y114F, V165I tässä tutkitussa isolaatissa ilmeni kaksi viimeistä.

Klebsiella pneumoniae acrR with mutation conferring multidrug antibiotic resistance  
Evalue: 2.66174e-159  
Score = 440 bits (1132), Expect = 3e-159, Method: Compositional matrix adjust.  
Identities = 213/216 (99%), Positives = 215/216 (99%), Gaps = 0/216 (0%)

ARD:3003373 (CARD)	MARKTKQQARETRQLILDVALRLFQQGVSSSTLATIAKAAGVTRGAIYWHFKNKSDLFN	60
ERS4228516 (Burkina_2)	MARKTKQQARETRQLILDVALRLFQQGVSSSTLATIAKAAGVTRGAIYWHFKNKSDLFN	60
ARD:3003373	EIWELSDASISDLEIEYRAKFPNDPLSVIREILVYVLEATVTEERRRLMMEIIFHKCEFV	120
ERS4228516	EIWELSDASISDLEIEYRAKFPNDPLSVIREILVYVLEATVTEERRRLMMEIIFHKCEFV	120
ARD:3003373	GEMTVVQQAQRQLSLASYERIEQTLKECIAAKLLPANLLTRRAAILMRSYLSGLMENWLF	180
ERS4228516	GEMTVVQQAQRQLSLASYERIEQTLKECIAAKLLPANLLTRRAA+LMRSYLSGLMENWLF	180
ARD:3003373	APDSFDLHAEARDYVAILLEMYQFCPTLRGPESLPA	216
ERS4228516	APDSFDLHAEARDYVAILLEMYQFCPTLRGPESLSA	216

**Kuva 5. Mutaatiot AcrAB-TolC-effluksipumpun aktiivisuutta säätelevän *acrR*-repressorin aminohapposekvenssissä.** Kuvassa on esitetty +-merkinnällä antibioottivaihdokset, joiden on aiemmin kirjallisuudessa todistettu edustavan antibioottiresistenssin kannalta merkittäviä pistemutaatiota AcrAB-TolC-effluksipumpun aktiivisuutta säätelevän *acrR*-repressorin sekvenssissä ja niiden läsnäolo Burkina\_2 genomien *acrR*-geeniä



koodaavassa aminohapposekvenssissä (Kuvassa sekvenssi ”ERS4228516, Burkina\_2”). Kahta Burkina\_2 -genomin sekvenssissä havaittua CARD:n proteiinivarianttimallin mukaisia (sekvenssin tunnus ARO:3003373 CARD-tietokannassa) aminohappovaihdosta on merkitty punaisella ja aminohapposekvenssissä havaitsematonta vihreällä värillä.

Burkina\_2-isolaatin genomista tunnistetut plasmidisekvenssit kuuluivat replikoniperheisiin IncN sekä IncY. Eri antibioottiresistenssigeenien ja liikkuvien geneettisten elementtien keskinäisiä ja välisiä yhteyksiä sekvenssissä havaittiin, mutta vähemmän, verrattaessa genomiin Burkina\_1.

### 13.7.3. *K. pneumoniae* -isolaattien virulenssigeenit

Työssä analysoitujen *K. pneumoniae* -isolaattien virulenssiominaisuuksia tutkittiin vertailemalla niitä aiemmin julkaistujen isolaattien virulenssigeeniprofiileihin. Nämä 12 vertailugenomia olivat peräisin sekvenssitietokannasta, ja ne edustivat pääosin klinisiä, patogeenisiä isolaatteja kuuluen maailmanlaajuisesti epidemioita aiheuttaviin sekvenssityyppeihin, kuten ST23 (GCA\_002163895) ja ST258 (GCA\_001952915) (Huang *et al.*, 2017). Lisäksi aineisto sisälsi yhden hypervirulentiksi määritetyn isolaatin (GCA\_002163895) (Xie *et al.*, 2018). Virulenssigeeniprofiileista muodostettiin lämpökartta, jossa samankaltaiset profiilit jakavat genomit asettuivat lähelle toisiaan Jaccardin etäisyyden mukaisesti (Kuva 6).

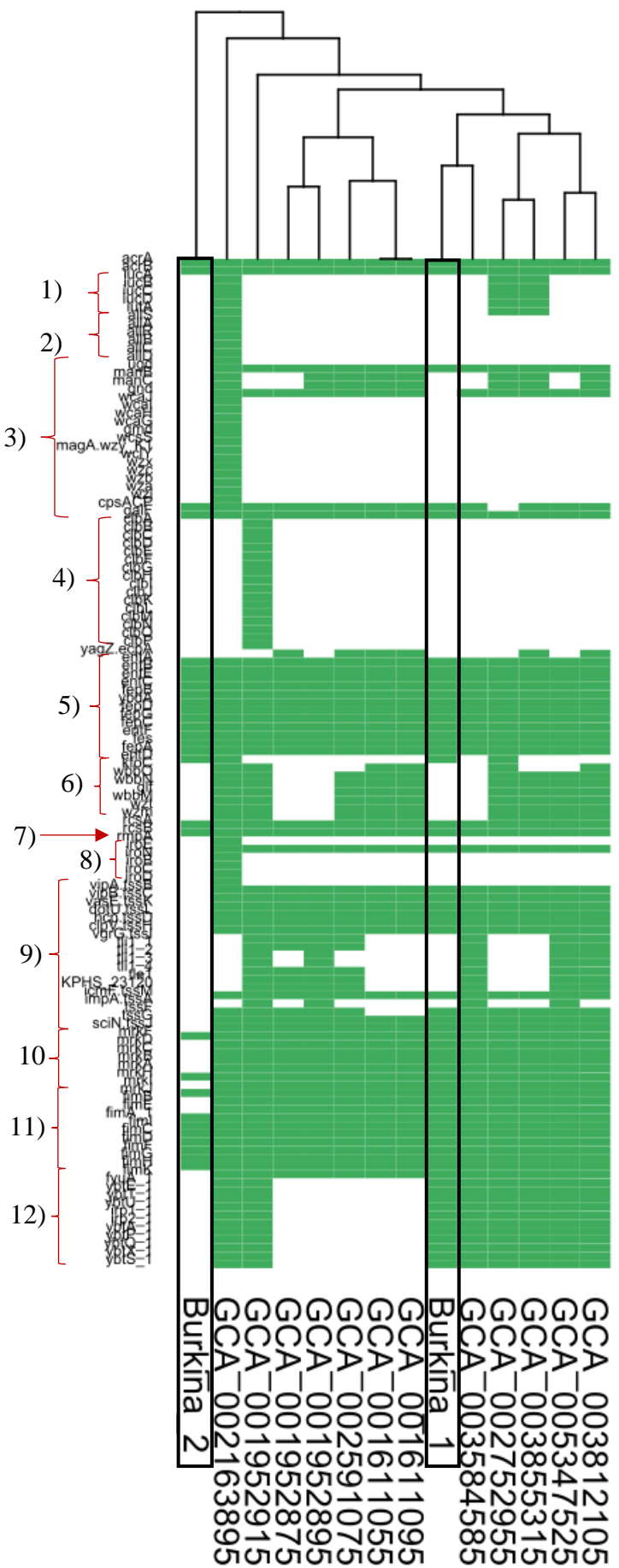
Aineiston hypervirulenttia kantaa edustanut *K. pneumoniae* -isolaatti GCA\_002163895 asettui lämpökartassa erilleen kaikista muista genomeista. Tämä isolaatti kantoi lukumäärällisesti eniten virulenssigeenejä. Lisäksi hypervirulentin kannan tunnusmerkkinä pidettyjä geenejä kuten K1-tyypin kapselisynteesiin liittyvät *rmpA*-, *rmpA2* ja *magA/wzy\_K1*-geenit (Fang *et al.*, 2007) havaittiin yksinomaan tässä kannassa. Näin ollen, tässä työssä sekvensoitujen Burkina\_1 ja Burkina\_2 tai muiden kuin genomien GCA\_002163895 voitiin todeta edustavan ei-hypervirulentteja *K. pneumoniae* -kantoja.

Lämpökartasta voitiin havaita genomien Burkina\_1 kantamien virulenssigeenien lukumäärän yltävän monien sairaalaepidemioiden aiheuttaneiden tietokannasta peräisin olevien isolaattien tasolle. Sen sijaan isolaatin Burkina\_2 kohdalla virulenssigeenien lukumäärä oli näihin verrattuna matala, jolloin se poikkesi kaikista lämpökartan muista genomeista eniten.

Lämpökartan perusteella genomi Burkina\_1 osoitti virulenssigeeniprofiilinsa myötä eniten samankaltaisuutta viiden tietokannasta peräisin olevan genomien kanssa (kuvassa Burkina\_1-genomin oikealla puolella). Tätä genomien ryhmää määritteli se, että ne kantoivat yersiniabaktiini-sideroforeja

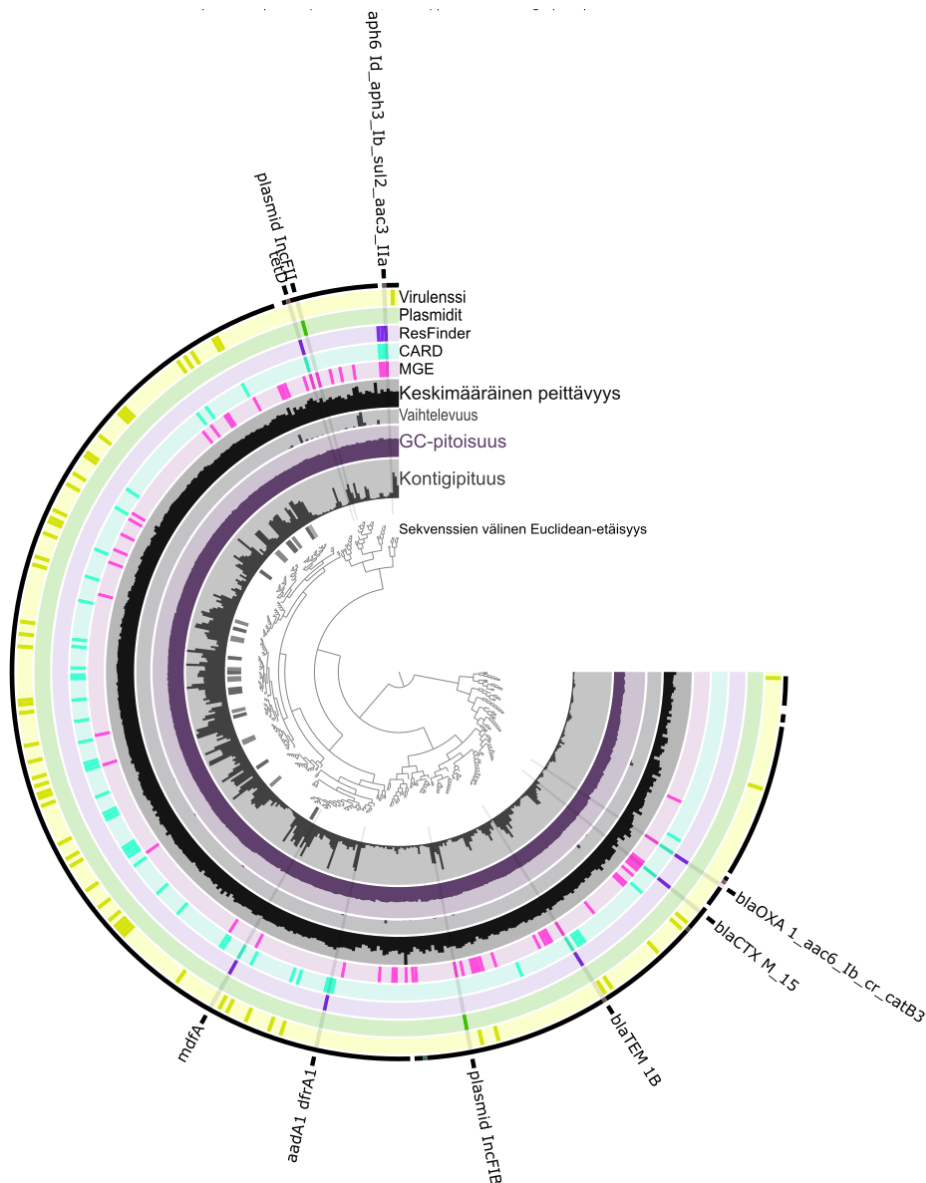
koodaavia geenejä *fyuA*, *irp1*, *irp2* ja *ybtAEPOSTUX* (Holt *et al.*, 2015). Ne poikkesivat kuitenkin hypervirulentista kannasta muun muassa kapselintuotantoon liittyviä geenien poissaolon myötä.

Yhteenvetona tässä sekvenssoiduista *K. pneumoniae* -isolaateista, tässä Pro gradu -työssä kuvattiin 16 kuukauden ikäisen lapsen ulostenäytteestä eristetty ESBL-positiivinen, sulfa-trimetopriimille vastustuskykyinen, korkeaan virulenssiin muun muassa yersiniabaktiini-virulenssigeenien myötä viittaava, sekvenssityypin 45 *Klebsiella pneumoniae* -kanta. Toisena isolaattina työssä kuvattiin aikuisen ulostenäytteestä eristetty monilääkeresistentti (penisilliinit, fluorokinolonit, tetrasykliini ja sulfa-trimetopriimi-yhdistelmäantibiootti), mutta ESBL-negatiivinen, tuntemattoman sekvenssityypin *K. pneumoniae* -kanta.



**Kuva 6: Virulenssigeeniprofiilien vertailu eri *K. pneumoniae* -isolaattien välillä.** Lämpökartalla esitetty vertailu muodostuu kahden tässä työssä sekvensoidun genomien (Burkina\_1 ja Burkina\_2, kuvassa korostettu mustalla) sekä 12 muun NCBI-tietokannasta noudetun genomisekvenssin välillä (Liite 5). Kuvassa vihreä väri merkitsee havaittua geeniä ja valkoinen sen poissaoloa. Virulenssigeeniprofiilit on esitetty Jaccard-etäisyyden mukaisessa järjestyksessä, jota myös lämpökartan ylälaidan dendrogrammi kuvaa. Numeroin ja tumman punaisin kaarisulkumerkein merkityt virulenssigeeniryhmät ovat seuraavat 1) aerobaktiinit 2) allantoiniimetabolia 3) kapselisynteesi 4) kolbaktiinit 5) enterobaktiinit 6) lipopolysakkaridi, LPS 7) K1-tyypin kapselia koodava geeni *mpa* 8) salmoteliniit (engl. salmotelini) 9) tyypin 6 sekreetiosysteemi, T6SS 10) tyypin 3 fimbriat 11) tyypin 1 fimbriat 12) yersiniabaktiinit.

#### 13.7.4. Malilaisen lapsen ulostenäytteestä eristetty *Escherichia coli* (isolaatti Mali\_1)



**Kuva 7: Malilaisen lapsen ulostenäytteestä eristetyn *E. coli* -genomin kokoaminen.** Kontigien keskimääräisissä pituuksissa on suurta vaihtelua Mali\_1-genomin splittien kesken.

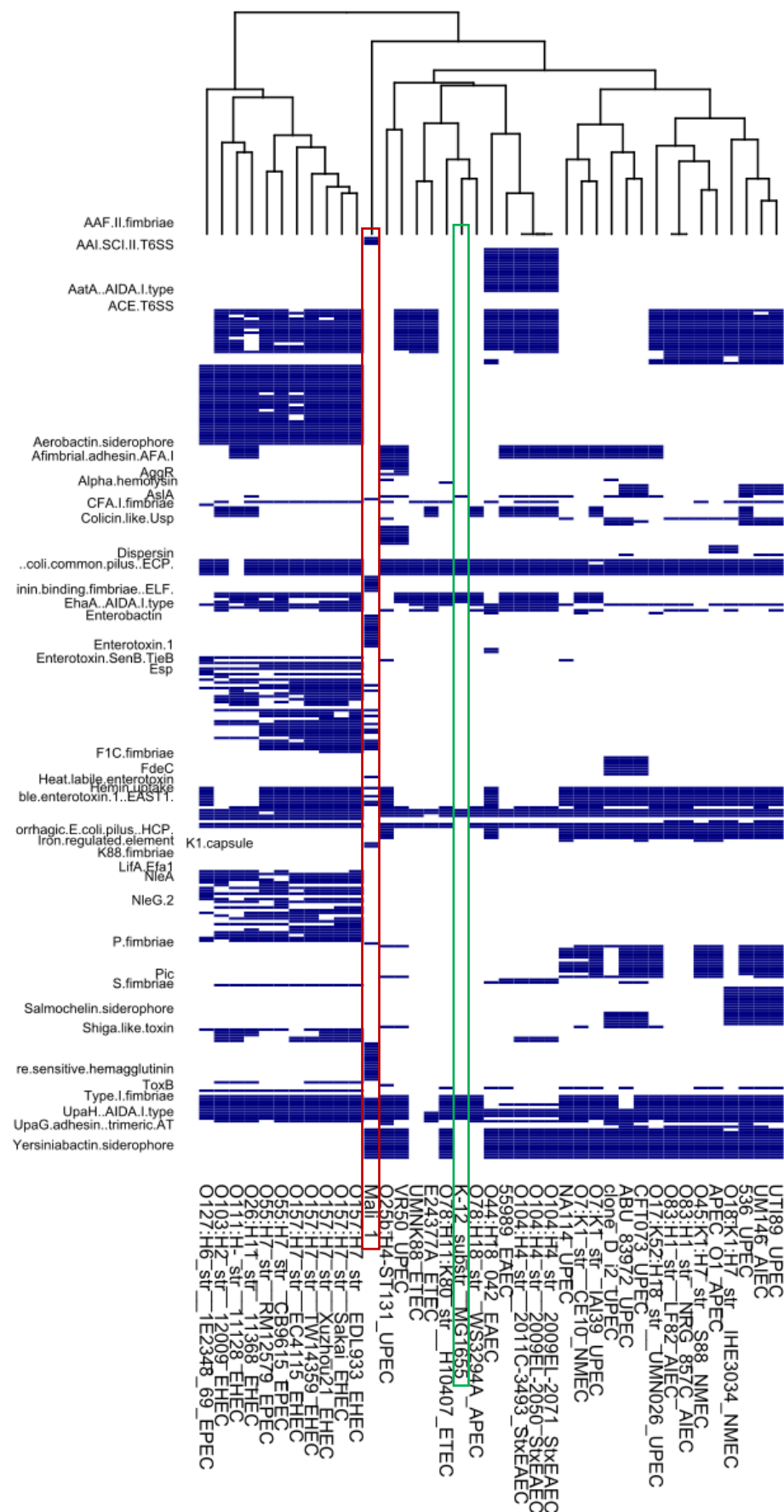
Genomi Mali\_1 edusti sekvenssityyppiä 38, ja genomisekvenssin visualisoinnissa se jakaantui 431:een splittiin (Kuva 7). Sekvenssialueilla, joissa sekä GC-pitoisuus että kontigien keskimääräinen pituus on matala, havaittiin vain muutamia antibioottiresistenssigeenejä, mikä saattoi viitata siihen, että näissä spliteissa sijaitsevat geenit eivät säilyneet kokonaisina, jolloin niiden koodaamien funktioiden tunnistaminen epäonnistui.

Genomi kantoi ESBL-geeniä *CTX-M-15* sekä kapeakirjoisesti beetalaktaamiantibiootteja hydrolysoivia entsyymejä koodaavia geenejä *OXA-1* sekä *TEM-1B*. Myös

aminoglykosidiresistenssigeenit *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib-cr*, *aadA1*, *aph(3'')-Ib* ja *aph(6)-Id* sekä kloramfenikoliresistenssigeeni *catB3* havaittiin. Geenit *dfrA1*- ja *sul2\_2* voitiin puolestaan yhdistää vastustuskykyyn sulfa-trimetopriimiyhdistelmäantibioottia kohtaan. Lisäksi sekvenssistä tunnistettiin tetrasykliiniresistenssigeeni *tet(D)\_1* sekä monilääkeresistenssipumppua koodaava *mdf(A)\_1*-geeni. Myös kahden eri monilääkeresistenssiin yhdistetyn effluksipumpun, EmrAB-TolC sekä EmrYK-TolC komponentteja koodaavat geenit oli havaittavissa tämän isolaatin genomissa. Kuitenkaan näiden ylituotantoon viittaavia tekijöitä, kuten mutaatioita transkriptionaalisessa repressorigeenissä *emrR* (Lomovskaya *et al.*, 1995) ei havaittu.

Edellä kuvattujen *K. pneumoniae* -isolaattien tavoin resistenssigeenit tässä *E. coli* -isolaatissa sijaitsivat usein monien liikkuvien geneettisten elementtien ympäröiminä sekä läheisesti toisiin antibioottiresistenssigeeneihin kytkeytyneinä. CTX-M-15-geenin geneettinen ympäristö oli lähes identtinen näytteessä Burkina\_1 havaittuun vastaavaan; IncFIB(K)-replikonityyppiin viittavia plasmidisekvenssejä myöden.

Näytteen Mali\_1 *E. coli* -isolaatin virulenssiominaisuudet poikkesivat kaikkien vertailuun sisällytettyjen patogeenisten ja ei-patogeenisten genomien virulenssigeeniprofiileista (Kuva 8, punainen korostus). Lämpökartassa kommensalistista, ei-patogeenista isolaattia edustanut *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 -kanta (kuvassa vihreä korostus) osoitti kantavan vain muutamia virulenssigeenejä. Työssä eristetty isolaatti Mali\_1 poikkesikin tästä kommensalistisesta kannasta merkittävästi laajemman virulenssigeeniprofiilinsa myötä. Virulenssigeeniprofiilien muodostamia yhtenäisiä klustereita voitiin havaita lämpökartassa esimerkiksi enterohemorragisten eli EHEC-kantojen kesken. Muutoin myös samaa patotyyppiä edustaneet genomit poikkesivat virulenssigeeniprofiileiltaan toisistaan melko paljon.



**Kuva 8: Virulenssigeeniprofiilit eri patotyyppisiä ja ei-patogeenisiä *E. coli* -kantoja edustavien genomien kesken.**

Virulenssigeeniprofiilit on esitetty Jaccard-etäisyyden mukaisessa järjestyksessä. Kuvassa sininen väri merkitsee havaittua geeniä ja valkoinen sen poissaoloa. Isolaatin Mali\_1 virulenssigeeniprofiili ei osoittanut samankaltaisuutta yhdenkään eri patotyyppiä tai toisaalta ei-patogeenistä kantaa edustavan virulenssigeeniprofiilin kanssa. Yksittäisten geenien sijaan kuvassa on esitetty virulenssigeeniryhmiä kuvaavat nimet.

Koska Mali\_1-isolaatin virulenssigeeniprofiili (Taulukko 6) ei muistuttanut yhtäkään vertailuun sisällytetyn genomista vastaavaa, virulenssigeenien yhteyksiä eri patotyyppisiin selvitettiin yksitellen kirjallisuudessa esiintyvien aiempien havaintojen perusteella. Geenikohtainen tarkastelu paljasti Mali\_1-isolaatin genomissa yhdistyvän sekä suolistoa että sen ulkopuolisia kudoksia infektoiville eri patotyypeille ominaisia virulenssigeenejä. Kaikkiin, enteroaggregatiivisiin, enterohemorraagisiin ja enteroinvasiivisiin *E. coli*-bakteereihin aiemmin yhdistettyjä geenejä voitiin tunnistaa (Taulukko 6).

**Taulukko 6: Virulenssigeenit Mali\_1-isolaatissa.** Taulukossa on listattu kaikki Mali\_1-isolaatin genotyyppissä havaitut virulenssigeenit. Geenin yhteyteen on merkitty sitä vastaava geeniryhmä sekä patotyyppi, jonka edustajille geeni on tunnusomainen tai jossa se on muun muassa tavattu. Lyhenteet viittaavat seuraaviin: EAEC = enteroaggregatiivista *E. coli*, NMEC = vastasyntyneillä meningiittiä aiheuttava *E. coli* (engl. neonatal meningitis causing *E. coli*), EHEC = enterohemorraaginen *E. coli*, UPEC = uropatogeeninen *E. coli* ja EIEC = enteroinvasiivinen *E. coli*.

Geeniryhmä	Geeni/geeniklusteri	Patotyyppi	Viite
AAF-fimbriat	<i>aggBCD</i>	EAEC	(Sheikh <i>et al.</i> , 2002)
AslA	<i>aslA</i>	NMEC	(Nicholson <i>et al.</i> , 2016)
Aerobaktiinit	<i>chuSUWY</i>	NMEC	(Nicholson <i>et al.</i> , 2016)
Dispersin-antiaggregaatioproteiini	<i>aap/aspU</i>	EAEC	(Sheikh <i>et al.</i> , 2002)
ECP-pilus (engl. <i>E. coli</i> common pilus)	<i>yagKVVWXYZ/ecpABCDER</i>	EHEC	(Rendó <i>et al.</i> , 2007)
Enterobaktiinit	<i>entABCDEFs, fepABCDG, fes</i>	NMEC, UPEC	(Nicholson <i>et al.</i> , 2016; Xu <i>et al.</i> , 2019)
FdeC-adheesioteikijä	<i>fdeC</i>	NMEC	(Xu <i>et al.</i> , 2019)
K1-kapseli	<i>kpsDM</i>	NMEC	(Kaper <i>et al.</i> , 2004)
LEE-koodattu tyypin 3 sekreetiosysteemi	<i>epsLRXY</i>	EHEC, EIEC	(Burkhard ja Wilks 2007)
OmpA	<i>ompA</i>	NMEC	(Iqbal <i>et al.</i> , 2016)
Shu-siderofori	<i>shuATVX</i>	EHEC, EIEC	(Burkhard ja Wilks 2007)
Tyypin 2 sekreetiosysteemi	<i>gspCDEFGHIJK</i>	EHEC, EIEC	(Yang 2005)
Tyypin 1 fimbrat	<i>fimABCDEFGH</i>	NMEC, UPEC	(Xu <i>et al.</i> , 2019)
Yersiniabaktiinit	<i>fyuA, irp12, ybtAEPQSTUX</i>	NMEC	(Holt <i>et al.</i> , 2015)

Eniten virulenssigeeniprofiililtaan Mali\_1-isolaatti muistutti vastasyntyneillä meningiittiä aiheuttavaa *E. coli* -kantaa. Erityisesti tämän puolesta puhui sen kantamat K1-kapselityypin koodaavat geenit *kpsM* sekä *kpsD*. Toisaalta yksikään työssä kuvatussa lämpökartassa aineistoon sisältyneistä kolmesta NMEC-kannasta ei osoittanut kantavan näitä K1-tyypin kapselituotannon merkkigeenejä. NMEC-kantoihin yhdistetyistä sideroforeista niin yersiniabaktiineja (geenit *fyuA*, *irp1*, *irp2* ja *ybtAEPQSTUX*), enterobaktiineja (geenit *entABCDEFs*, *fepABCDG* ja *fes*) kuin kromosomaalisia (geenit *chuSUWY*) aerobaktiineja koodaavat geenit voitiin tunnistaa Mali\_1-

genomin virulenssigeenien joukosta. Sen sijaan, usein NMEC-kantoihin yhteydessä raportoituja plasmidivälitteisiä aerobaktiinigenejä (geenit *iut/icuABCD*) (Nicholson *et al.*, 2016) ei havaittu. Muista NMEC-kannoille ominaisista virulenssigeeneistä isolaatti kantoi pintoihin tarttumista edesauttavia rakenteita koodaava *fdeC*-geeniä sekä bakteerin aivojen mikrovaskulaarisen epiteelikudoksen läpäisemiseen liitettyä *aslA*-geeniä. Myös havaitut soluinvaasiossa merkittävät ulkomembraaniproteiinia OmpA ja tyypin 1 fimbrioita koodaavien geenien kanssa viittasivat NMEC-kantaan.

Kuten jo lämpökartan avulla oli nähtävissä, Mali\_1 edusti poikkeuksellisen heterogeenista virulenssigeeniprofiilia, sillä NMEC-kantoihin yhdistettyjen virulenssigeenien lisäksi myös lukuisia muiden patotyyppien kesken yleisiä virulenssigeenejä voitiin havaita, mikä vaikeutti isolaatin todellisen virulenssikyvyn arvioimista. Myöskään *in silico* -serotyypityksestä ei ollut apua NMEC-kannan varmentamiseksi Mali\_1-isolaatin kohdalla sillä sen O-serotyyppi oli tuntematon. H-serotypeistä kanta edusti tyyppiä H:30.

Yhteenvetona, työssä kuvattiin malilaisen noin 5 kuukauden ikäisen lapsen ulostenäytteestä eristetty ESBL-positiivinen, monilääkeresistentti (penisilliinit, fluorokinolonit, gentamysiini, sulfa-trimetopriimi-yhdistelmäantibiootti ja tetrasykliini), virulenssiominaisuuksiltaan heterogeeninen, mutta eniten vastasyntyneiden meningiittiä aiheuttavaa kantaa muistuttava, sekvenssityypin 38 *Escherichia coli* -kanta.

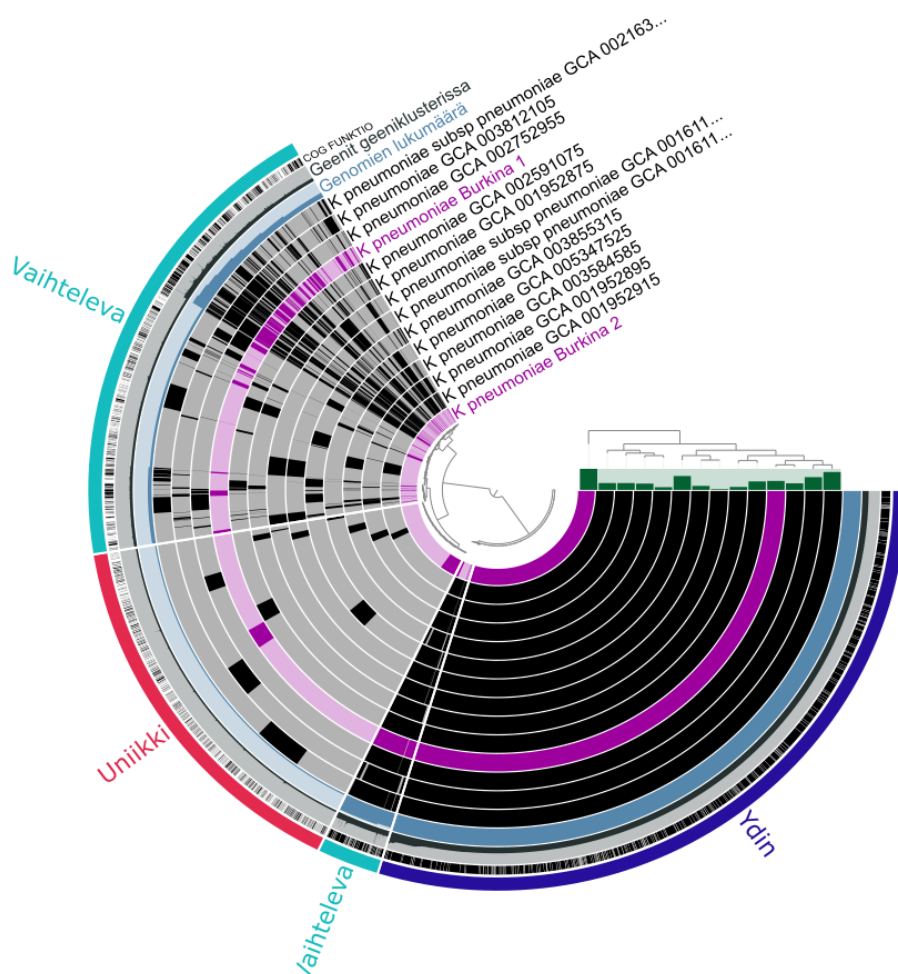
### 13.8. *Klebsiella pneumoniae* -pangenomi

Työssä muodostettiin 14 *K. pneumoniae* -genomia käsittävä pangenomi, jotta analysoituja genomeita voitiin verrata esimerkiksi aiemmin kuvattujen *K. pneumoniae* -isolaattien resistenssi- ja virulenssiominaisuuksiin. Pangenomi rakentui kaiken kaikkiaan 8619 geeniklusterista, joiden läsnä-tai poissaolo kunkin genomin suhteen määräsi näiden järjestyksen kehällä (Kuva 9). Pangenomin ydin (kuvassa ”Ydin”), eli geeniklusterit, jotka esiintyivät kaikissa 14:ssä genomissa, muodosti 45 % pangenomin kaikista geeniklustereista. Vastaavasti geeniklusterit, jotka olivat läsnä ainoastaan yksittäisissä genomeissa, muodostivat 23 %:a kaikista geeniklustereista (kuvassa ”Uniikki”). Loput 33 % geeniklustereista esiintyivät useammassa kuin yhdessä, mutta eivät kaikissa genomeissa muodostaen pangenomin vaihtelevan (kuvassa ”Vaihteleva”) osan.

Genomien samankaltaisuutta kuvaavan dendrogrammin mukaisesti genomi Burkina\_2 poikkesi selvästi kaikista muista genomeista. Sen sijaan Burkina\_1-genomi muistutti eniten genomia



GCA\_002752955, jonka Srijan ja kollegat (2018) kuvasivat thaimaalaisessa sairaalassa suoritettun rutiininomaisen kolistiiniresistenssin seulonnan yhteydessä. Kyseinen *K. pneumoniae* -kanta osoittautui kolistiiniresistenssigeenin lisäksi 12 muun antibioottiresistenssigeenin kantajaksi. Näiden kahden genomin (Burkina\_1 ja GCA\_002752955) samankaltaisuutta voitiin selittää osaksi niiden jakaman saman sekvenssityypin 45 avulla (Kuva 12a). Geeniklustereiden samankaltaisuudet näiden isolaattien välillä saattoi merkitä yhdenmukaisuuksia myös antibioottiresistenssi- ja virulenssigeenien tai plasmidisekvenssien suhteen.



**Kuva 9: *Klebsiella pneumoniae* -pangenomi.** Genomit asettuivat rinnakkain eri geeniklustereiden esiintymisen läsnä- tai poissaoloon perustuvan samankaltaisuuden mukaiseen järjestykseen. Genomien samankaltaisuutta toisiinsa nähden on kuvattu Euclidean-etäisyyteen perustuvalla dendrogrammilla. Dendrogrammin alapuolella vihreällä on osoitettu genomeissa esiintyvien uniikkien geeniklustereiden osuus suhteessa toisiinsa. Uloin kehä viittaa COG-funktioiden (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) läsnä- tai poissaoloon kussakin geeniklusterissa. Nämä funktiot edustavat NCBI:n tietokannan kokogenomisekvensseissä esiintyviä proteiineja koodaavia geenejä. Seuraavaksi uloin kehä kuvaa kussakin geeniklusterissa esiintyvien geenien lukumäärää ("Geenit geeniklusterissa"). Vaaleansininen kehä ("Genomien lukumäärä") esittää niiden genomien lukumäärän jossa kukin geeniklusteri esiintyy.

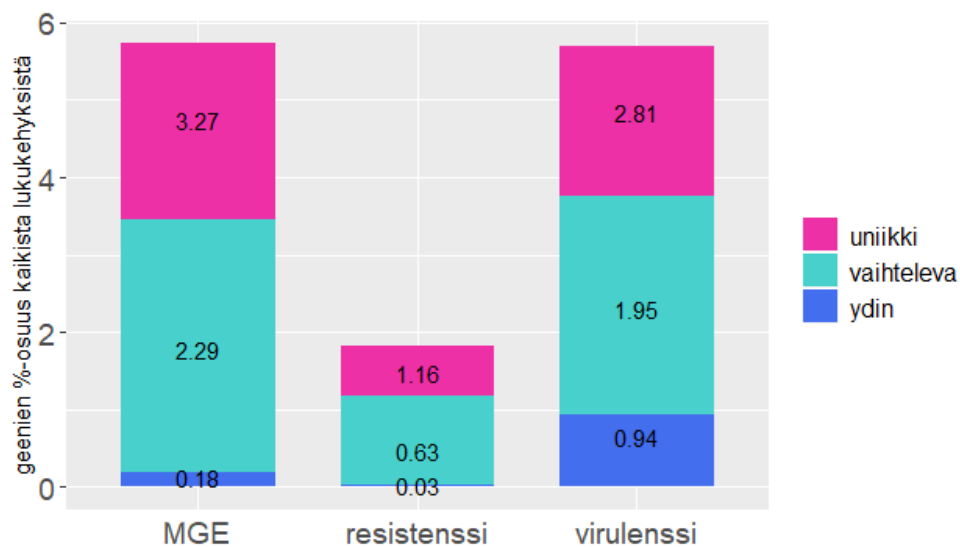
Pangenomin eri genomeissa havaituista plasmideista suuri osa kuului tyyppiin IncF-plasmidiperheeseen (Taulukko 7). Näistä erityisesti IncFIB(K) havaittiin kaikissa paitsi yhdessä CTX-M-tyypin geenin kantajaisolaatissa.

**Taulukko 7. Plasmidityypit ja ESBL-, karbapenemaasigeenit pangenomin genomeissa.** Taulukossa on esitetty tässä työssä sekvensoitujen genomien Burkina\_1 ja Burkina\_2 (Taulukko 1; Taulukko 3) sekä tietokannasta peräisin olevien, pangenomianalyysiin sisällytettyjen genomien (Liite 5) kantamat plasmidireplikonityypit sekä beetalaktamaasigeenit. Beetalaktaameista ainoastaan ESBL-, AmpC- (taulukossa geeni *DHA-1*) sekä karbapenemaasientsyymeitä, mutta ei kapeakirjoisia beetalaktamaaseja koodaavat geenit on merkitty taulukkoon. Genomit, joista plasmidireplikoneja ei löydetty, eivät myöskään kantaneet näitä entsyymejä koodaavia geenejä.

Genomi	Plasmidityyppi	ESBL - /karbapenemaasi-geeni
Mali_1	IncFIB(AP001918)	<i>CTX-M-15</i>
Burkina_1	IncFIB(K)	<i>CTX-M-15</i>
Burkina_2	IncY IncN	-
GCA_001611055	-	-
GCA_001611095	-	-
GCA_001952875	IncFIB(K)	<i>KPC-2, CTX-M-15, SHV-11</i>
GCA_001952895	IncFIB(K) FIA(pBK30683) IncFII(29) IncN repA	<i>KPC-3, CTX-M-15</i>
GCA_001952915	IncFIB(K) IncA/C2 IncFIB(pQil) IncFIA(HI1)	<i>KPC-2, CTX-M-2, OXA-9</i>
GCA_002163895	IncFIB(K) IncHIIB IncFIB(pKPHS1)	<i>SHV-12, DHA-1</i>
GCA_002591075	IncFIA(HI1) IncFIB(K) IncHIIB IncFIB(pQil) IncFIA(HI1) IncFIB(pB171)	<i>NDM-1, CTX-M-15, SHV-11, SHV-12</i>
GCA_002752955	IncFIB(K) IncX4 IncFIB(pKPHS1)	<i>CTX-M-55</i>
GCA_003584585	IncA/C2 IncN	<i>KPC-2</i>
GCA_003812105	IncFIB(K) IncFIA(HI1)	-
GCA_003855315	IncHIIB IncFIB(Mar) IncFIB(pKPHS1) IncFII(29) ColpVC	<i>CTX-M-15, SHV-5</i>
GCA_005347525	-	-

### 13.8.1. Antibioottiresistenssigeenien, virulenssigeenien sekä liikkuvien geneettisten elementtien esiintyvyydet ja suhteet pangenomissa

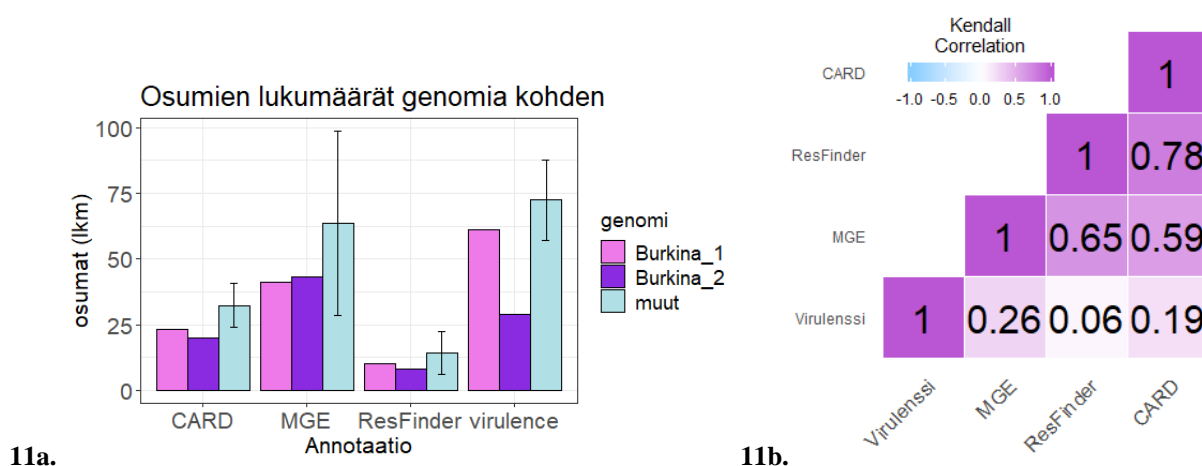
Pangenomianalyysin avulla voitiin selvittää tässä työssä tutkittujen isolaattien kantamien antibioottiresistenssigeenien virulenssigeenien vertautumista aiemmin kuvattujen kantojen vastaaviin. Proteiineja koodaavista sekvensseistä valtaosa, noin 76 %, sijaitsi ydingenomissa, siinä missä ainoastaan 3 % näistä sekvensseistä lukeutuivat uniikkien geeniklusterien joukkoon. Vaihtelevalla sekvenssialueella osuus kaikista avoimista lukukehyksistä oli 21 %. Havaitut antibioottiresistenssigeenit, virulenssigeenit ja liikkuvat geneettiset elementit (MGE) jakautuvat eri suhteissa pangenomin eri osioiden (ydin, vaihteleva ja uniikki) kesken (Kuva 10). Näistä kolmesta funktior ryhmästä virulenssigeenit olivat resistenssigeenejä ja liikkuvia geneettisiä elementtejä useammin läsnä kaikissa 14 genomissa. Liikkuvista geneettisistä elementeistä vain pieni osa oli läsnä kaikissa genomeissa, ja antibioottiresistenssigeeneistä yhä pienempi osuus. Tulokset viittasivat siihen, että näissä eri *K. pneumoniae* -genomeissa antibioottiresistenssigeenejä mobilisoi eri liikkuvat geneettiset elementit.



**Kuva 10: Eri funktioiden osuus kaikista pangenomin, ytimen, uniikkien, ja vaihtelevien alueiden sekvensseistä.** Kuvassa y-akselilla on esitetty kutakin funktiota (liikkuvien geneettisten elementtien (MGE), ResFinder-tietokannan osumien mukaista antibioottiresistenssiä sekä virulenssia) koodaavien geenien osuus kaikista proteiineja koodaavista geeneistä pangenomissa. Nämä geenit on värikoodattu sen mukaan esiintyvätkö ne kaikissa genomeissa (ydin, tummansininen) vain yhdessä genomissa (uniikki, aniliinipunainen) vai useammassa kuin yhdessä, mutta ei kaikissa genomeissa (vaihteleva = vaaleansininen).

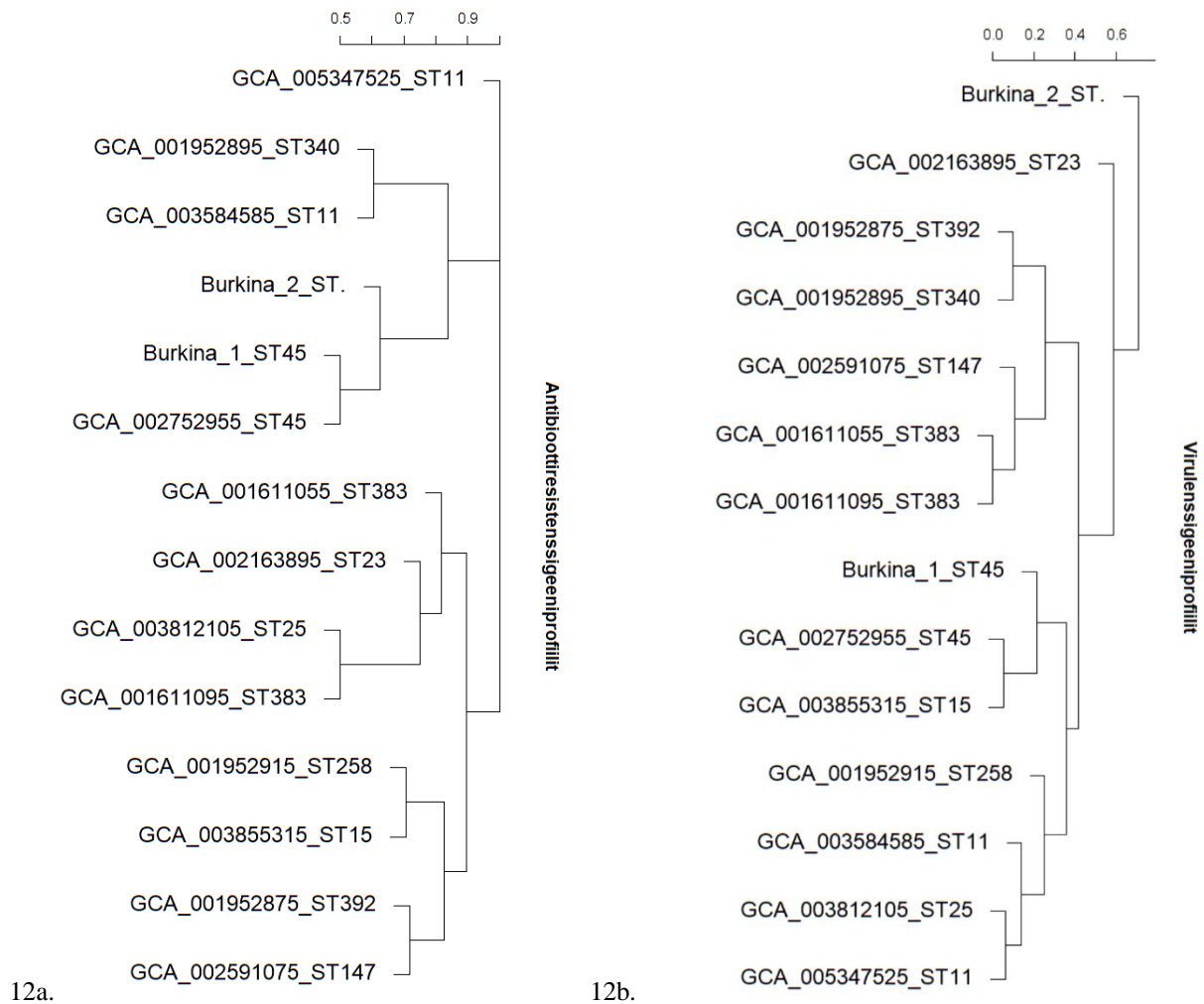
*K. pneumoniae* -isolaatin Burkina\_1 kohdalla sekä virulenssigeenien että ResFinder-tietokannan avulla havaittujen resistenssigeenien lukumäärät vastasivat 12 tietokannasta peräisin olevien niin kutsuttujen ”verrokkigenomien” vastaavia keskiarvoja, joissa virhemarginaalina käytettiin 95 % (Kuva 11a). Tämä tarkoitti sitä, että isolaatin resistenssi- ja virulenssigeenien määrä vertautui kliinisistä epidemioista eristettyjen kantojen vastaavien geenien määriin. Burkina\_2-isolaatti ylsi tälle samalle tasolle ainoastaan antibioottiresistenssigeenien osalta. Samaan aikaan kuitenkin CARD-tietokannan mukaisesti näytteet Burkina\_1 ja Burkina\_2 kantoivat merkitsevästi vähemmän resistenssielementtejä. Tämä ero oli todennäköisesti seurausta tietokantojen keskinäisistä erilaisuuksista. Isolaatin Burkina\_2 tapauksessa virulenssigeenien lukumäärä oli genomia Burkina\_1 sekä 12 muuta genomia merkitsevästi matalammalla tasolla. Merkitsevää eroa liikkuvien geneettisten elementtien suhteen ei havaittu kummankaan tässä tutkitun genomien kohdalla, minkä voitiin ajatella olevan odotettua resistenssigeenejä kuljettavan ominaisuutensa myötä. Tätä yhteyttä selvitettiin lisää näiden elementtien välisen korrelaation tarkastelun avulla.

Resistenssigeenien lukumäärät (ResFinder) korreloivat positiivisesti ( $r = 0,65$ ,  $p = 0,0016$ ) geneettisten liikkuvien elementtien lukumäärän kanssa, kun analyysissä hyödynnettiin ResFinder-tietokannan tuloksia (Kuva 11b). CARD-tietokannan suhteen lähes yhtä vahva korrelaatio havaittiin ( $r = 0,59$ ,  $p = 0,0036$ ). Erot tietokantojen välillä voitiin nähdä myös näiden välisestä korrelaatiosta, joka jäi alle luvun 1 ( $r = 0,78$ ,  $p = 0,00014$ ). Antibioottiresistenssigeenien ja virulenssigeenien lukumäärien välinen korrelaatio ei ollut merkitsevä kummankaan antibioottiresistenssitietokannan kohdalla (ResFinder:  $r = 0,057$ ,  $p = 0,78$ ; CARD:  $r = 0,19$ ,  $p = 0,35$ ). Tämä oli totta myös virulenssigeenien ja liikkuvien geneettisten elementtien suhteen ( $r = 0,26$ ,  $p = 0,21$ ). Tulokset viittasivat siihen, että liikkuvat geneettiset elementit ovat yhteydessä antibioottiresistenssigeeneihin, mahdollisesti osallistuen näiden mobilisoitumiseen. Viitteitä liikkuvien geneettisten elementtien vastaavasta roolista virulenssigeenien kohdalla ei havaittu.



**Kuva 11. Funktionaaliset annotaatiot ja niiden suhde toisiinsa. 11a.** Näyte Burkina\_1 (aniliinipunainen) kantoi yhtä paljon virulenssigeenejä kuin pangenomin 12 muuta genomia (vaaleansininen). Näytteen Burkina\_2 (tummansininen) kohdalla virulenssigeenien lukumäärä oli merkitsevästi alhaisempi. Liikkuvien geneettisten elementtien lukumäärissä eri genomien välillä ei havaittu merkitsevää eroa. Antibioottiresistenssigeenien lukumäärien suhteen tulosten tulkinta oli vaikeaa eri tietokantojen antamien erilaisten tulosten vuoksi. **11b.** Kuvassa on esitetty Kendallin korrelaatio eri funktioita edustavien geenien lukumäärien välillä. Luvut merkitsevät korrelaatiokerrointa. Antibioottiresistenssigeenien lukumäärä korreloi positiivisesti geneettisten liikkuvien elementtien kanssa pangenomissa.

Antibioottiresistenssigeenien ja liikkuvien geneettisten elementtien yhteydelle saatiin vahvistusta vertailemalla keskenään pareittain kunkin genomien uniikkeja resistenssigeeniprofiileja sekä liikkuvista geneettisistä elementeistä muodostettuja profiileja. Genomien resistenssigeeniprofiilien suhteet toisiinsa nähden on esitetty kuvassa 12a. Myös genomien sekvenssityypityksen tulokset on esitetty tässä dendrogrammissa. Genomi GCA\_005347525 edusti sekvenssityyppiä ST11, ei ST78, kuten sekvenssin julkaisijat raportoivat (Paul *et al.*, 2019). Syynä tälle ristiriitaiselle tuloksella saattoi olla se, että tässä työssä käytettiin MLST komentoriviversiota 2.16.2, siinä missä alkuperäisessä julkaisussa käytettiin verkkoselainversiota 1.7. Isolaatti Burkina\_1 muistutti resistenssiprofiililtaan eniten samaan sekvenssityyppiin kuuluvaa genomia GCA\_002752955, yleisellä tasolla eri genomien resistenssirprofiilit eivät mukailleet sekvenssityyppien mukaista jaottelua toisin kuin virulenssigeeniprofiilien tapauksessa (Kuva 12b).



**Kuva 12: Dendrogrammi pangenomin genomeista näiden resistenssi- ja virulenssigeeniprofiileihin perustuvassa järjestyksessä, joka perustuu Jaccard-etäisyyteen. 12a.** Kuvassa genomien keskinäinen läheisyys merkitsee resistenssigeeniprofiilien samankaltaisuutta. Näyte Burkina\_1 muistutti eniten isolaattia GCA\_002752955, joka edusti niin ikään sekvenssityyppiä 45. Myös tuntemattomaan sekvenssityyppiin kuulunut Burkina\_2 muistutti resistenssiprofiililtaan eniten näitä kahta genomia kuin mitään muuta. Muut keskenään samaan sekvenssityyppiin kuuluvat parit, kuten ST11 (GCA\_003584585 ja GCA\_005347525) sekä ST383 (GCA\_001611055 ja GCA\_001611095) osoittivat vähemmän samankaltaisuutta resistenssiprofiiliensa perusteella. **12b.** Vastaavassa virulenssigeeniprofiileita kuvaavassa dendrogrammissa havaittiin resistenssigeenejä enemmän sekvenssityyppien mukaista samankaltaisuutta.

Resistenssigeeniprofiilit sekä liikkuvista geneettisistä elementeistä muodostuneet profiilit korreloivat merkittävästi keskenään (Mantel  $r = 0,2171$ ,  $p = 0,02$ ). Tulos viittasi siihen, että tietyt antibiootiresistenssigeenit esiintyivät tiettyjen liikkuvien geneettisten elementtien yhteydessä. Resistenssigeenien ja virulenssigeenien sekä virulenssigeeni ja liikkuvien geneettisten elementtien välillä merkitseviä yhteyksiä ei havaittu (ResFinder ja VFDB:  $r = 0,1099$   $p = 0,152$ ; MGE ja VFDB:  $r = 0,1083$ ,  $p = 0,147$ ).

Myöskään genomien Euclidean-etäisyyteen perustuvan nukleotidisamankaltaisuuden ja eri funktioiden välillä ei havaittu merkitsevää korrelaatiota (ResFinder:  $r = -0,06381$ ;  $p = 0,965$ ; MGE:  $r = -0,1922$ ;  $p = 0,965$ ; VFDB:  $r = -0.4262$ ,  $p = 0.999$ ).

Yhteenvedona näistä tuloksista, *K. pneumoniae* -kannoissa antibioottiresistenssigeenien voitiin todeta olevan virulenssigeenejä todennäköisemmin yhteydessä liikkuviin geneettisiin elementteihin. Tämä viittasi resistenssigeenien horisontaaliseen geeninsiirtoon liittyvään alkuperään näissä isolaateissa. Lisäksi samaa sekvenssityyppiä edustaneiden isolaattien virulenssigeeniprofiilien samankaltaisuus viittasi näiden ominaisuuksien olevan enemmän lateraalisen kuin horisontaalisen geeninsiirron seurausta. Suurempi pangenomianalyysiin sisällytettyjen genomien lukumäärä olisi todennäköisesti tuottanut merkitsevimpiä tuloksia näiden johtopäätösten tueksi.

## 14. Tulosten tarkastelu

Tässä Pro gradu -työssä kuvattiin Burkina Fasossa ja Malissa ulostenäytteistä sekä jätevesinäytteistä eristettyjen monilääkeresistenttien *Enterobacteriaceae*-kantojen fenotyyppisiä sekä genotyyppisiä ominaisuuksia. Näistä isolaateista etenkin pienten lasten suolistossaan kantamat *E. coli*- ja *K. pneumoniae* -kannat jakoivat monia piirteitä sairaalaepidemioiden aiheuttajina tunnettujen kantojen kanssa. Ne molemmat edustivat maailmanlaajuisesti usein sairaalaepidemioiden yhteydessä kuvattuja sekvenssityyppejä ja osoittivat ESBL-entsyymituotannon ohella vastustuskykyä lukuisille kliinisesti merkittävälle antibiooteille. Lisäksi isolaattien genotyyppiset virulenssigeeniprofiilit viittasivat korkean tason virulenssiin. Yhtenä tutkimuksen puutteista, nämä kuvatut isolaatit toimivat ainoastaan esimerkkeinä tutkituissa ulostenäytteissä esiintyvistä kannoista, sillä kaikkia kasvatusmenetelmin valikoituja isolaatteja ei tutkimuksen rajoissa ollut mahdollista fenotyyppittää saati genotyyppittää.

### 14.1. Monilääkeresistentit *K. pneumoniae* -isolaatit Burkina Fasossa

Burkinafasolaisen pienen lapsen ulosteesta eristettiin enterobakteerikantoja, joiden mahdollisesti aiheuttamiin infektioihin käytettävissä olevien antibioottien valikoima on hyvin kapea – tai jopa olematon Burkina Fason kaltaisissa maissa, joissa ”viimeisen vaihtoehdon” antibioottien, kuten karbapeneemien saatavuus on hyvin rajallista (Manenzhe *et al.*, 2015). Fenotyyppisten resistenssimääritysten myötä noin vuoden ikäinen Burkina Fason pienessä Nanoron kylässä asuva lapsi osoittautui vähintään kahden eri ESBL-positiivisen, yhden *E. coli*- ja yhden *K. pneumoniae* -

bakteerin kantajaksi. Tulos ei ollut yllättävä tietäen Ouagadougoussa sairaalapotilailla raportoidun ESBL-kantajuuden olevan jopa 58 % (Ouedraogo *et al.*, 2016), eikä yleinen ESBL-kantajuus vaikuta rajoittuvan ainoastaan sairaaloihin, vaan koskee myös tervettä väestöä (Ouédraogo *et al.*, 2017). Lisäksi Ouedraogon ja kollegoiden kuvaamat ESBL-kantajien osuudet olivat todennäköisesti aliarvioita, sillä beetalaktaami-beetalaktamaasi-inhibiittoriyhdistelmäantibiooteille vastustuskykyisiä kantoja ei seulottu lainkaan. Näiden isolaattien esiintyminen myös Burkina Fasossa voitiin todistaa tässä työssä lapsen ulostenäytteestä eristetyn beetalaktamaasi-inhibiittoreille vastustuskykyä osoittaneen *K. pneumoniae* -kannan myötä (Burkina\_1). Tämä havainto korostaa lisätestien tärkeyttä beetalaktamaasi-inhibiittoreiresistenttien kantojen seulomiseksi. Näin välttyttäisiin vääriltä diagnooseilta ja edelleen resistenssiä lisäävien, sopimattomien antibioottien käytöltä.

Erityisen mielenkiintoista tämän isolaatin kohdalla oli se, että ilmiäsen beetalaktamaasi-inhibiittori-resistenssistä huolimatta vastaavaan genotyyppiin viittaavia AmpC-geenejä (Coudron *et al.*, 2000) ei havaittu. Syytä havaitulle fenotypille etsittiin seuraavaksi isolaatin kantamien kapeakirjoisesti beetalaktaameja hajottavien TEM-1 ja SHV-1-entsyymivarianteista mahdollisten inhibiittori-resistenssiin vaikuttavien aminohappovaihdosten osalta (Cantón *et al.*, 2008; Robin *et al.*, 2006). Tässä tapauksessa kuitenkin sekvenssit vastasivat 100 %:n samankaltaisuudella niitä vastaavia referenssisekvenssejä molemmissa tietokannoissa (ResFinder, CARD), joten todennäköisimmäksi selitykseksi jäi erityisen vahvan promootorin aiheuttama SHV-1- (Miro *et al.*, 1998; Sanders *et al.*, 1988) tai TEM-1-tyypin geenin (Sanders *et al.*, 1988; Wuf *et al.*, 1995) poikkeuksellisen korkean tason ilmentyminen.

Työssä eristetty *K. pneumoniae* -isolaatti edusti maailmanlaajuisesti sairaalaepidemioiden aiheuttajana tunnettua sekvenssityypin 45 *K. pneumoniae* -kanta (Baraniak *et al.*, 2013; Marando *et al.*, 2018; Matsumura *et al.*, 2015). Kannan fenotypissä havaittu ESBL-tuotto oli seurausta globaalisti laajimmin levinneen, tässä tapauksessa todennäköisesti IncFIB(K)-tyypin plasmidin kantaman CTX-M-15-geenin ansiota. Myös lukuisat muut isolaatin kantamat antibioottiresistenssigeenit sijaitsivat lähellä toisiaan sekä liikkuvia geneettisiä elementtejä, mikä saattoi viitata niiden sijaintiin samassa plasmidissa. Yhteisvalinta-periaatteen mukaan on syytä olettaa, että antibioottivalintapaineen kohdistuessa vain yhtä tai muutamaa resistenssigeeniä kohtaan myös kaikki muut plasmidin kantamat resistenssigeenit säilyvät populaatiossa (Tamminen *et al.*, 2011).

Kapselityypinsä osalta isolaatti ei täyttänyt hypervirulentin *K. pneumoniae* -kannan kriteerejä. Tästä huolimatta kanta osoitti poikkeuksellisen laajaa virulenssigeeniprofiilia, mikä viittasi sen ominaisuuksiin taudinaiheuttajana. Virulenssigeeneistä merkittävimpiä olivat bakteerin



raudanhankintaan liittyvät, isännän veressä selviytymistä edesauttavat yersiniabaktiini-rakenteita koodaavat geenit (Holt, *et al.*, 2015). Myös tyypin 1 ja 3 fimbrioita koodaavien geenien läsnäolo viittasi korkean tason virulenssiin, näiden rakenteiden vastatessa puolestaan bakteerin adheesioon liittyvistä toiminnoista (Struve *et al.*, 2015) sekä biofilmin muodostumisesta (Gerlach *et al.*, 1988), jotka molemmat yhdistetään *K. pneumoniae* -lajin taudinaiheuttajakantoihin.

Isolaatin virulenssigeeniprofiili oli lähes täysin identtinen aiemmin Tansaniassa kuvattujen myös samaa sekvenssityyppiä 45 edustavien *K. pneumoniae* -kantojen kanssa. Tämä Marandon ja kollegoiden (2018) kuvaama kanta aiheutti vastasyntyneiden teho-osastolla puhjenneen sairaalaepidemian, joka johti vastasyntyneitten sepsikseen, eli verenkiertoon edenneeseen infektiin (engl. neonatal sepsis). Vaikka tässä työssä kuvattua isolaattia todellinen, fenotyyppissä ilmentyvä virulenssikyky jäi tämän Pro gradu -työn osalta tuntemattomaksi, viittasi kannan virulenssigeeniprofiili vahvasti Marandon ja kollegoiden kuvaamaan vastasyntyneillä sepsistä aiheuttavaan patogeeniseen *K. pneumoniae* -kantaan. Tällaisten patogeenien kantajuus luo itsessään merkittävän riskin kyseisen bakteerin aiheuttaman veri-infektion syntymiselle (Gorrie *et al.*, 2017). Tässä työssä havaittu jopa kolmannen sukupolven kefalosporiinien tehottomuus vastaavan virulenssikykyyn omaavia kantoja kohtaan toimii huolestuttavana esimerkkinä antibioottiresistenssiongelman seurauksista.

Burkinafasolaisen aikuisen ulostenäytteestä eristetyn *K. pneumoniae* -isolaatin virulenssigeeniprofiili oli suppea, mikä saattoi tarkoittaa sitä, että kyseessä oli ei-patogeeninen kanta. Toisaalta työn aineisto ei sisältänyt ei-patogeenista verrokkikantaa, jota vasten tehtävä virulenssigeeniprofiilin vertailu olisi vahvistanut tämän johtopäätöksen.

Joka tapauksessa kuvattu *K. pneumoniae* -isolaatti osoitti korkean tason antibioottiresistenssiä. Se oli vastustuskykyinen fluorokinoloneille, sulfa-trimetopriimille sekä tetrasykliinille. Monilääkeresistenssi oli mielenkiintoinen havainto kannassa, jonka sekvenssityyppi ei vastannut yhtäkään aiemmin kuvattua *K. pneumoniae* -kantaa. Isolaatin poikkeuksellisuus oli nähtävissä myös työn pangenomianalyysissä, jossa sen voitiin havaita erottuvan selvästi kaikista 13 muusta genomista geeniklustereidensa perusteella. Lisäksi isolaatin kantamat plasmidit edustivat muista työssä tarkastelluista *K. pneumoniae* -kannoista poikkeavia replikonityyppejä. Näiden tulosten perusteella voitiin horisontaalisella geeninsiirrolla päätellä olleen suuri merkitys tämän kannan genomien muovautumisen kannalta, mistä myös lukuisat antibioottiresistenssigeenit saattoivat olla osoitus. Isolaatti ei kantanut ESBL-geeniä välittävää plasmidia, mutta sellaisen hankkiminen saattoi olla vain ajan ja sattuman kysymys. Resistenssiä levittävien kantojen seurannan kannalta tällaisten herkästi

ulkoista geneettistä materiaalia omaksuvien kantojen kuvaaminen on tärkeää. Tässä kokogenomisekvenssianalyysillä ja sekvenssityypin määrittämisellä on merkittävä rooli.

#### 14.2. Korkean virulenssin monilääkeresistentti *E. coli* -isolaatti Malissa

Noin viiden kuukauden ikäinen lapsi osoittautui ESBL-positiivisen *E. coli* -bakteerin kantajaksi. Tämä isolaatti oli vastustuskykyinen kolmannen sukupolven kefalosporiinien lisäksi lukuisille antibiooteille jopa viidestä eri antibioottiluokasta. Edellä kuvatun burkinafasolaisen lapsen ulostenäytteestä eristetyn *K. pneumoniae* -isolaatin tavoin se kantoi IncFIB(K)-tyypin plasmidin koodaamaa ESBL-geeniä *CTX-M-15*.

Erittäin laajan sekä genotyyppisen että fenotyyppissä ilmenevän antibioottiresistenssiprofiilin lisäksi poikkeuksellisen tästä sekvenssityypin ST38 *E. coli* -isolaatista teki sen virulenssigeeniprofiili, joka muodostui useita eri patogeenisia *E. coli* -patotyyppejä määrittävistä virulenssigeeneistä. Tällaisia eri patotyyppejä yhdistäviä niin kutsuttuja hybridikantoja on raportoitu esiintyvän nimenomaan sekvenssityypin 38 edustajissa myös aiemmin. Esimerkiksi virtsatieinfektioita aiheuttavia kantoja, joissa yhdistyvät sekä uropatogeeniselle että enteroaggregativiselle *E. coli* -patogeenille ominaisia virulenssigeenejä on kuvattu (Alghoribi *et al.*, 2015; Chattaway *et al.*, 2014; Rafaque *et al.*, 2019). Tässä työssä kuvattu isolaatti saattoi kuitenkin olla osoitus vieläkin pidemmälle edenneestä virulenssigeeniprofiilin muovautumisesta, sillä sen genomista voitiin löytää useampaa kuin kahta eri patotyyppiä määrittäviä virulenssigeenejä. Edellä mainittuja patotyyppejä edustaville *E. coli* -kannoille tyypillisten virulenssigeenien lisäksi se kantoi useita vastasyntyneillä aivokalvontulehdusta eli meningiittiä aiheuttavaan *E. coli* (NMEC) -kantaan yhdistettyjä geenejä. Näistä merkittävimpänä, isolaatti osoittautui K1-kapselityyppiä koodaavien geenien kantajaksi. Noin 80 % näitä geenejä koodaavista *E. coli* -kannoista on arvioitu lukeutuvan vastasyntyneillä meningiittiä aiheuttaviin NMEC-kantoihin (Kaper *et al.*, 2004).

NMEC-tyypin *E. coli* on vastasyntyneiden keskuudessa meningitoksen yleisin aiheuttaja ja sen rooli lapsikuolleisuuden aiheuttajana on suuri (Kaper *et al.*, 2004). Antibioottien tehon laskiessa tällaisia patogeeneja kohtaan, kuten tämän työn äärimmäisen resistentin kannan kohdalla havaittiin, saattaisi lisätä NMEC-kantojen aiheuttamiin infektoihin yhdistettyä kuolleisuutta edelleen. Joka tapauksessa, etenkin virulenssigeeniprofiilin poikkeuksellisuudesta johtuen, kyseisen isolaatin todellisen, fenotyyppissä ilmenevän virulenssikyvyn arvioiminen pelkän genotyyppin perusteella oli tämän Pro gradu -työn rajoissa mahdotonta.

Kannan edustaman heterogeenisen virulenssigeeniprofiilin syntyä saattaisi selittää sen evolutiivisessa historiassa tapahtunut ulkoisen geneettisen materiaalin hankkiminen muun muassa plasmidien, patogeenisuusaarekkeiden tai bakteriofaagien avulla (Dozois & Curtiss, 1999). Schaufler ja kollegat (2018) kuvasivat vastaavien sekvenssityypin 38 *E. coli* -kantojen levittävän IncFIB(K)-plasmidivälitteisesti *CTX-M-15*-geeniä Malin naapurimaassa Guineassa tutkitussa rottapopulaatiossa. Etenkin kaupungeissa monilta osin ihmisen kanssa elinympäristön jakavat rottapopulaatiot saattavat toimia resistenttien, ihmiselle patogeenisten *E. coli* ja myös *K. pneumoniae* -kantojen reservinä. Kokogenomisekvenssianalyysistä huolimatta kirjoittajat eivät kuvanneet kantojen virulenssigeenejä, mutta jatkotutkimuksena tälle työlle olisi kiinnostavaa ja hyödyllistä selvittää kannan virulenssiominaisuuksia suhteessa tässä työssä kuvattuun kantaan.

*CTX-M-15*-geeniä koodaavia ST38 *E. coli* -kantoja on havaittu myös muissa villieläimissä, kuten eri lajien linnuissa Mongoliassa (Guenther *et al.*, 2017). Sekvenssityypissä usein esiintyvä heteropatogeenisuus saattaakin olla seurausta tarpeesta sopeutua laajaan isäntäkirjoon. Guentherin ja kollegoiden kuvaamista isolaateista poikkeuksellisen teki osassa isolaateissa havaittu *CTX-M-15*-geenin liittyminen osaksi bakteerin kromosomia, mikä mahdollisti sekä virulenssi- että ESBL-geenien klonaalisen levittäytymisen.

Karbapeneemejä käytetään tyypillisesti silloin kuin on aihetta olettaa, että beetalaktaamiantibiootit eivät kykene kukistamaan infektion aiheuttavaa kantaa. Pro gradu -tutkielmassa ei havaittu karpabeneemeille resistenttejä kantoja, jotka aiheuttavat ongelmia etenkin, jos kannat ovat vastustuskykyisiä myös muille antibiooteille. Kuitenkin maissa kuten Burkina Faso ja Mali, joissa karbapeneemien saatavuus on huono, myös laajakirjoisille beetalaktaameille resistenttien bakteerien aiheuttamat infektiot voivat johtaa hoidolliseen umpikujaan, sillä toimivaa antibioottia ei välttämättä ole saatavilla. Tästä huolimatta OXA-48-typin karbapenemaasin tuottajabakteerien esiintymistä on kuvattu jopa endeemiseksi ainakin Pohjois-Afrikassa (Poirel & Nordmann, 2012). Malissa ensyymien kantajabakteereita on raportoitu satunnaisesti (Pitout *et al.*, 2019). Ensimmäinen löydös Malissa tehtiin vuonna 2017 sairaalapotilaasta eristetyistä näytteistä (Sangare *et al.*, 2017). Potilaalla ei ollut matkailuhistoriaa Malin ulkopuolella, mutta paikallisten sairaaloiden välillä sen sijaan kyllä. Potilaiden ja hoitohenkilökunnan nopean vaihtuvuuden lisäksi riittämätön sairaalahygienian ylläpito, kuten tehottoman alkoholipitoisen puhdistusaineen käyttö ovatkin todennäköisesti sekä ESBL- että karbapenemaasigeenien leviämistä mahdollistavia tekijöitä malilaisissa sairaaloissa (Sangare *et al.*, 2017). Sekvenssityypin 38 *E. coli* luetaan OXA-48-typin geenien levittämisen kannalta korkean riskin sekvenssityyppeihin, sillä näiden kantojen on havaittu kantavan sekä plasmidivälitteistä että

kromosomiin integroitunutta OXA-48-tyypin entsyymiä koodaavaa geeniä maailmanlaajuisesti (Pitout *et al.*, 2019).

### 14.3. Isolaattien alkuperä

Työssä tutkittujen ulostenäytteiden luovuttajien terveydentila tai terveyskeskukseen hakeutumisen syy olivat vain osin tiedossa, ja tietojen puutteellisuus rajoitti tulosten merkityksen arvioimista. Burkinafasolaisen lapsen tiedettiin ainoastaan kärsivän ripulioireista, mikä saattoi viitata siihen, että ESBL-kannan kolonisaatio oli tapahtunut jo ennen sairaalaan saapumista. Se, että vasta 16 kuukauden ikäinen lapsi on jo mahdollisesti sairaalaan saapuessaan monilääkeresistentin potentiaalisesti sepsistä aiheuttavan patogeenin kantaja antaa huolestuttavan kuvan Burkina Fasossa sijaitsevan pienen Nanoron kaupungissa vallitsevasta resistenttien bakteerien osuudesta terveen väestön kesken. Tietäen toisaalta *Enterobacteriaceae*-kantojen yleisen vertikaalisen siirtymisen äidiltä lapselle (Asnicar *et al.*, 2017), ja toisaalta Länsi-Afrikan maissa vallitsevan ESBL-bakteerikantajuuden korkean tason (Alonso *et al.*, 2017; Bulabula *et al.*, 2017; Ouédraogo *et al.*, 2017), lasten ESBL-bakteerien kantajuutta todennäköisesti selitti näiden äitien ESBL-kantajuus.

Vaihtoehtoisesti, kuvattujen kantojen suolistokolonisaation hankkiminen sairaalaympäristöissä toimisi osoituksena käynnissä olevasta sairaalaepidemiasta Burkina Fason Saint Camillen sairaalassa sekä Malin Yirimadjon terveyskeskuksessa. Tässä tapauksessa sairaalakantojen havaitseminen – saati leviämisen estäminen on ollut mahdotonta ilman minkäänlaista resistenssin seurantarjestelmää.

Pitäen mielessä yleisesti Afrikassa vallitsevan resistenssin korkean tason (Hendriksen *et al.*, 2019) myöskään ympäristön toimimista ESBL-bakteerin varhaisen suolistokolonisaation lähteenä ei voida poissulkea. Viemäriverkostojen puutteellisuudesta johtuen Burkina Fason ja Malin kaltaisissa maissa esimerkiksi sairaalajätevesien kuljetus pitkän välimatkan päähän kaupunkiin jätevedenpuhdistamolle toteutuu vain joissain tapauksissa. Toisaalta näiden jätevedenpuhdistamoiden rooli antibioottiresistenssiongelman kannalta voi olla jopa käänteinen. Esimerkiksi Algeriassa sijaitsevassa jätevedenpuhdistamossa muun muassa CTX-M-tyypin resistenssigeenien havaittiin säilyvän ja toisaalta niitä kantavien bakteerien jopa rikastuvan jäteveden käsittelyprosessissa (Alouache *et al.*, 2014). Burkina Fasossa kerätyn sairaalajätevesinäytteen havaittiin sisältävän erittäin korkean tason resistenssiä ilmentäviä enterobakteerikantoja, ja näiden jätevesien päätyminen ympäristöön sellaisinaan tai Alouachen ja kollegoiden kuvaaman kaltaisen käsittelyn jälkeen muodostaa merkittävän riskin monilääkeresistenttien bakteerien leviämisen kannalta. Erityishuolta herättää

sairaalajätevesissä esiintyvien vastustuskykyisten taudinaiheuttajabakteerien päätyminen ympäristöön, jolloin niille altistumisen riski ihmisten ja eläinten kesken kasvaa.

Pienelle lapselle ominaisella suolistomikrobiomin taksonomisella koostumuksella (Dogra *et al.*, 2015) voidaan perustella ESBL-kannan hankkimiseen ja säilyttämiseen liittyviä riskejä suhteessa aikuisiin. Enterobakteerien ja etenkin *K. pneumoniae* -bakteerien suhteellinen runsaus (Dogra *et al.*, 2015) lisää välillisesti horisontaalisen geeninsiirron myötä hankittujen resistenssigeenien suhteellista esiintyvyyttä koko suolistomikrobiomissa (Wyres ja Holt 2018).

#### 14.4. *Klebsiella pneumoniae* -genomin ominaisuudet

*Klebsiella pneumoniae* -genomin muovautuvuus todistettiin tässä työssä muutamien eri tavoin. 14:stä genomista muodostettu pangenomi kattoi vain alle puolet lajityypillisistä geeneistä, mikä viittasi hankitun geenimateriaalin tuomaan suureen vaihteluun geeniklustereiden esiintyvyydessä eri genomien välillä. Määritelmä ”avoin pangenomi” luonnehtii genomityyppiä, jonka kaikkien geenien esittämiseen pangenomin avulla vaadittaisiin määrittämätön, hyvin suuri määrä kyseisen lajin genomeita (Tettelin *et al.*, 2008). *K. pneumoniae* -lajin pangenomi on määritetty ”avoimeksi pangenomiksi” aiemmin (Wyres ja Holt 2018). Myös tämän työn tulokset viittasivat suureen geneettiseen vaihteluun *K. pneumoniae* -genomien välillä. Uniikkien ja vaihtelevien geeniklustereiden osuus suhteessa kaikkien genomien kesken jaettujen geeniklustereihin nähden oli suuri. Lajin moninaiset roolit esimerkiksi ihmisissä sekä kommensalistina että patogeenina saattaa toimia paineena uuden geenimateriaalin hankkimisen kannalta (Stecher *et al.*, 2013), ja näin genomien vaihtelevuutta selittävänä tekijänä. Vastaavasti, bakteerin pyrkimyksessä selviytyä antibioottien läsnäolossa genomien plastisuudesta on hyötyä. Esimerkiksi antibiootteja hajottavia entsyymejä koodaavia geenejä kuljettavien plasmidien hankkimisesta on hyötyä tässä mielessä. Todisteena horisontaalisen geeninsiirron myötä hankituista ja mahdollisesti edelleen leviävistä resistenssigeeneistä työssä havaittiin näiden geenien yhteydet liikkuviin geneettisiin elementteihin.

Yksittäisistä liikkuvista geneettisistä elementeistä plasmidisekvenssien lisäksi esimerkiksi IS91- sekä *ISEcp1*-tyyppien insertiosekvenssien sijaitsivat resistenssigeenien välittömässä läheisyydessä, jolloin niiden voitiin ajatella toimivan resistenssigeenejä liikuttavina elementteinä. Tässä työssä IS91-elementtien kuljettamien resistenssigeenien ilmentymistä ei voitu kuitenkaan todistaa, sillä esimerkiksi *aph(6)-Id*-geenin koodaamaa streptomysiini-, kanamysiini- tai tobramysiiniresistenssiä (Robicsek *et al.*, 2006) ei testattu isolaatin fenotyyppityksessä. Niin ikään IS91-elementin

koodaamasta tetrasykliiniresistenssigeenistä *tet(A)*\_6 huolimatta tässä tutkittu isolaatti ei osoittanut fenotyyppistä resistenssiä tetrasykliiniä kohtaan. Tälle havainnolle ei löydetty selitystä.

Liikkuvien geneettisten elementtien, kuten plasmidien, siirtyminen on usein laji- tai kantakohtaista (Partridge *et al.*, 2018), joten työn tulosten pohjalta oli mahdotonta arvioida havaittujen liikkuvien geneettisten elementtien todellista kykyä siirtää resistenssigeenejä eteenpäin esimerkiksi yli lajirajojen. Yleisestikin tässä työssä geenien liikkuvuuden arvioiminen perustui ainoastaan aiempaan näihin mobiilielementteihin yhdistettyyn tietoon niiden liikkuvuudesta. Todellisen, esimerkiksi plasmidivälitteisen resistenssigeenien liikkuvuuden todistaminen olisi vaatinut konjugaatiokokeita *in vitro*.

Valtaosa työn pangenomiin sisällytetyistä isolaateista edusti monilääkeresistenttejä, ja useat plasmidivälitteisiä ESBL- tai karbapenemaasientsyymejä koodaavia, kantoja. Tätä sekvenssitietokantojen tuottamaa vinoumaa oli vaikea välttää, sillä kokogenomisekvenssointi on yhä verrattain arvokas menetelmä (Balloux *et al.*, 2018), minkä vuoksi sen hyödyntäminen painottuu toistaiseksi pääosin kliinisesti merkittävien kantojen analysoimiseen. Tämä tietynlaisten genomien edustus saattoi tuottaa virhelähteen muun muassa pangenomianalyysissä havaitun, horisontaalisen geeninsiirrosta johtuvan vaihtelevan genomien laajuuteen. Tämä puolestaan saattoi näkyä resistenssigeenien poikkeuksellisen runsautena sekä niitä kantavien tiettyjen plasmidien yliedustuksena. Esimerkiksi runsaina edustetut IncF-tyypin plasmidireplikonit tunnetaan antibioottiresistenssigeenien, kuten *CTX-M-14*, *CTX-M-15*, *aac(6')-Ib-cr* ja *TEM-1B* välittäjinä enterobakteereissa (Marcadé *et al.* 2009). Toisaalta näiden plasmidien on havaittu sopeutuneen erityisen hyvin isäntäänsä jo ennen resistenssigeenien siirtymistä IncF-ryhmän plasmideihin. (Datta *et al.*, 1980).

Virulenssigeenien havaittiin sijaitsevan antibioottiresistenssigeeneihin verrattuna useammin ydingenomissa viitaten niiden kromosomaaliseen sijaintiin. Tätä tuki myös se, että tilastollisesti merkitsevää korrelaatiota virulenssigeenien ja liikkuvien geneettisten elementtien välillä ei havaittu. Tällöin näiden geenien samanaikainen esiintyminen yhdessä isolaatissa saattaisi olla enemmän seurausta resistenssiplasmidin siirtymisestä korkean virulenssin omaavaan kantaan kuin näiden geenien siirtymisestä saman plasmidin välittämänä. Kuitenkin myös suuri osa virulenssigeeneistä esiintyi pangenomin uniikeissa ja vaihtelevissa geeniklustereissa. Myöskään absoluuttista johtopäätöstä ydingenomissa esiintyvän geenin ja tällöin sen kromosomaalisen sijainnin välillä ei voida vetää, sillä yhtäläillä myös plasmidin koodaamat virulenssigeenit voivat olla läsnä kaikissa pangenomin genomeissa. Ja toisaalta kromosomissa sijaitsevat virulenssigeenit eivät välttämättä ole läsnä kaikissa tutkituissa genomeissa, jolloin ne lukeutuvat vaihtelevan tai uniikin pangenomin

alueisiin. Tässä työssä käytettyjen menetelmien rajoissa virulenssigeenien liikkuvuuden varma arviointi oli mahdotonta.

#### 14.5. Kokogenomisekvenssianalyysi menetelmänä

Kokogenomisekvenssianalyysi on nostanut suosiotaan antibioottiresistenssitutkimuksessa, ja myös mikrobiologisen diagnostiikan yhteydessä. Kuitenkin menetelmää koskevat standardit osoittavat merkittäviä puutteita, jolloin tulosten tulkinnan yhteneväisyys kärsii (Doyle *et al.*, 2019; Ellington *et al.*, 2017). Fenotyyppisiä ja genotyyppisiä menetelmiä yhdistämällä voitiin tässä työssä käytetystä pienestä aineistosta huolimatta havaita johdonmukaisuuksia eri geenien merkityksissä fenotyyppissä ilmentyvän resistenssin kannalta.

EUCAST-standardin mukaisten testien suorittaminen johti kaikissa tapauksissa oikeaan tulokseen ESBL-tuoton tunnistamisen suhteen, myös beetalaktamaasi-inhibiittoreille vastustuskykyisten kantojen kohdalla. Viimeinen oli mahdollista ESBL-varmistustestiin sisällytettyjen EUCAST:n suosittamien ”ylimääräisten” testiantibioottien, kefepiimin ja atstreonaamin myötä. Ilman lisätestejä esimerkiksi isolaatti Burkina\_1 olisi tulkittu ESBL-negatiiviseksi. Näin ollen työn tulosten valossa lisätestien merkitystä ei tulisi aliarvioida.

Ampisilliiniresistenssi kaikissa isolaateissa oli seurausta kapea- tai laajakirjoisista beetalaktamaasientsyymeistä. Aminoglykosiditransferaaseja koodaavista geeneistä erityisesti *aac(3)-IIa* vaikutti johtavan fenotyyppissä ilmenevään gentamysiiniresistenssiin. Myös aminoglykosiditransferaaseihin luettava geeni *aac(6')-Ib-cr* vaikutti tässä kahden isolaatin kohdalla aiheuttavan vastustuskyvyn fluorokinoloneihin kuuluvaa siprofloksasiinia kohtaan, kuten aiemmin kuvattu (Robicsek *et al.*, 2006). Kolmas siprofloksasiinille vastustuskykyinen isolaatti kantoi geeniä *qnrS1*, mikä on aiemmin yhdistetty matalan tason fluorokinoloniresistenssiin (Domínguez-Herrera *et al.*, 2013). Osassa isolaateissa havaitun kinoloniantibioottien ulosvirtaukseen yhdistetyn OqxAB-pumppua koodaavien geenien ilmentymistä siprofloksasiiniresistenssinä ei havaittu (Bin Kim *et al.*, 2009). Fenotyypin tetrasykliiniresistenssi voitiin yhdistää tetrasykliinieffluksipumppua koodaaviin geeneihin *tet(A)\_4* ja *tet(D)\_1* (Roberts 2005), mutta ei geenivariantin *tet(A)\_6* kohdalla. Syy siihen että viimeksi mainitun geenivariantin ilmentymistä ei havaittu, saattoi liittyä sitä kuljettavan IS91-elementin kykyyn kopioida geeni kokonaisuudessaan oikein mukaan lukien promoottorisekvenssi.

Lisäksi molempien tai kiinnostavasti vain jommankumman, sulfametsasoliresistenssigeenin (*sul2\_2*) tai trimetopriimiresistenssigeenin (*dfrA*), läsnäolon havaittiin riittävän tuottamaan osalle isolaateista

vastustuskyky sulfa-trimetopriimi-yhdistelmäantibioottia vastaan. Aiemmin vastaavaa ilmiötä selittäviksi tekijöiksi spekuloituja kromosomaalisia mutaatioita (Amador *et al.*, 2019) ei tässä työssä tutkittu.

Kokogenomisekvenssinanalyysin avulla oli eri isolaateissa mahdollista tunnistaa kaksi eri antibioottiresistenssigeeniä, joita ei työn fenotyyppityksessä testattu. Geeni *fosA\_5* on aiemmin yhdistetty korkean tason fosfomysiiniresistenssiin (Huang *et al.*, 2017). Sen sijaan *catB3*-kloramfenikoliasetyylitransferaasigeenin merkityksestä fenotyyppiseen resistenssiprofiiliin on saatavilla vain rajallinen määrä tietoa, joten sen ennustaminen oli vaikeaa näiden isolaattien kohdalla.

OmpK36-poriinin sekvenssissä ei havaittu resistenssin kannalta ratkaisevia pistemutaatioita (Wong *et al.*, 2019) yhdenkään tutkitun genomin kohdalla, mikä oli odotettua kaikkien isolaattien osoittaessa herkkyyttä karbepeneemiantibiootteja kohtaan. Tavanomaisten OmpK35 ja OmpK36-poriineja koodaavien sekvenssien lisäksi myös ”ylimääräisiä”, antibiootteja vähemmän läpäiseviä OmpK37-poriinia koodaavia sekvenssejä (Doménech-Sánchez *et al.*, 1999) havaittiin molemmissa tutkituissa *K. pneumoniae* -isolaateista. Kuitenkin CARD-tietokannan mukaisen proteiini ”knock out”-mallin mukaiset kriteerit eivät täyttyneet, joten tämän poriinin roolia resistenssin kannalta oli vaikea arvioida. Lisäksi kaikissa tapauksissa ”tavanomaisten” OmpK36 ja OmpK36-poriinin läsnäolo olisi kumonnut OmpK37-poriinin resistenssiä lisäävän vaikutuksen (Doménech-Sánchez *et al.*, 1999).

Effluksipumppuja koodaavien geenien (*AcrAB-TolC*, *EmrAB-ToC* *EmrYK-TolC*, *Mdf(A)*), ja näissä mahdollisesti esiintyvien mutaatioiden roolia tässä työssä ei myöskään voitu arvioida lukuisten muiden samanaikaisesti vaikuttavien resistenssigeenien rinnalla.

Ilman tietoa geenien ilmentymisestä, bakteerikannan virulenssikykyä ei voida ennustaa yksin virulenssigeeniprofiilin perusteella. Tilannetta monimutkaistaa edelleen eri patotyyppien määrittelyssä käytettyjen merkkigeenien vaihteleva käyttö kirjallisuudessa. Tämä vaihtelevuus saattaa olla osoitus aiemmin patotyyppien luokittelussa hyödynnettyjen menetelmien rajallisuudesta. Kuten Kallonen ja Boinett (2016) esittivät, bioinformatiikan menetelmiin perustuva vertaileva tutkimus tulee todennäköisesti paljastamaan yliyksinkertaistuksia mitä tulee esimerkiksi eri *E. coli* -patotyyppien luokitteleviin genotyyppiin perustuviin määritelmiin. Virulenssigeeniprofiiliensa mukaisesti eri patotyypeille ominaisia virulenssigeenejä kantavat niin kutsutut hybridikannat, kuten *E. coli* -isolaatti (Mali\_1) tässä työssä saattavatkin toimia esimerkkinä tästä ilmiöstä. Tämä ei vie pois havaintoa kuvatun isolaatin ennennäkemättömästä heterogeenisuudesta tämän virulenssigeeniprofiilissa, mikä ei toisaalta liene yllätys alueelta kerätyn vähäisen kokogenomisekvenssitiedon vuoksi.



Kokogenomisekvenssianalyysin tulosten kannalta hyödynnettyjen tietokantojen merkitys on merkittävä. Tällä hetkellä samaan tarkoitukseen luotuja tietokantoja tai muita bioinformatiikan työkaluja on saatavilla useita. Nämä ovat monesti yksittäisen tutkimusryhmän tiettyyn tarkoitukseen tai tietyille näytetyypille luomia tietokantoja (Ellington *et al.*, 2017), mikä lisää tulosten epätarkkuutta ja vaihtelua eri laboratorioden välillä (Doyle *et al.*, 2019). Eri tietokantojen päällekkäisyydet ja toisaalta eroavaisuudet monimutkaistavat tulosten tulkintaa. Myös tässä työssä samaa funktiota koodaavien geenien etsimisessä oli hyödynnettävä useita eri tietokantoja. Mitä tulee resistenssielementtien tarkastelussa käytettyihin tietokantoihin, ovat erot esimerkiksi ResFinder ja CARD-tietokantojen välillä verrattain suuria, mikä on tiedostettava näitä tietokantoja käyttäessä. CARD-tietokanta osoittaa myös geenit, joiden sekvensseissä esiintyvät mutaatiot on yhdistetty vastustuskykyiseen fenotyyppiin (Jia *et al.*, 2017). Tämä rajoittaa tietokannan käyttöä kvantitatiivisissa tutkimusasetelmissa, sillä haun osumat vaativat usein läpikäyntiä mahdollisten mutaatioiden varmistamiseksi. Toisaalta se tarjoaa tarkan menetelmän tapauksissa, joissa tavoitteena on esimerkiksi selvittää joidenkin tiettyjen yksittäisten geenien läsnäoloa tai niissä esiintyviä mutaatioita.

Myös liikkuvien geneettisten elementtien etsinnässä käytettiin kahta eri tietokantaa, jotka nekään eivät vaikuttaneet riittävän, sillä tutkimusaiheen kannalta merkittävä insertiosekvenssi *ISEcp1* ei sisältynyt kumpaankaan näistä. Tämän vuoksi kolmantena tietokantana olisikin voitu hyödyntää esimerkiksi ISFinder-työkalua (Siguier *et al.*, 2006), mikä olisi tuottanut yksityiskohtaisempaa tietoa työn tuloksissa antibioottiresistenssigeenejä koodaavista insertiosekvensseistä, ja niiden roolista antibioottiresistenssigeenin leviämisen kannalta.

Toisaalta, erityisesti lyhyiden lukusekvenssien annotointiin suunnitellulla MGEFinder-tietokannalla olisi todennäköisesti voitu tuottaa nykyistä tarkempia tuloksia liikkuvien geneettisten elementtien tarkasta sijainnista ja tyypistä tässä tapauksessa (Durrant *et al.* 2019). Ohjelma hyödyntää sekä genomien *de novo* -kokoamista että linjausta referenssigenomia vasten. Ohjelman sisäänrakennetun niin kutsutun ”mustache”-työkalun avulla genomien proteiineja koodaavien sekvenssien ulkopuoliset, potentiaalisesti insertiosekvenssejä koodaavat sekvenssit ennustaa linjaamalla genomi ensin MGEFinder-ohjelman sisäistä tietokantaa ja lisäksi referenssigenomia vasten. Näin voidaan luoda insertiosekvenssejä kuvaavat konsensussekvenssit (Durrant *et al.* 2019). Tällä menetelmällä tuotetut tulokset ovat riippumattomia tietokantojen referenssisekvensseistä, ja siksi tarkempia.

Tietokantoihin ja BLAST-hakuun perustuvat menetelmät saattavat rajoittaa uudenlaisten geenivarianttien löytämistä käytettyjen tietokantojen puutteellisen edustavuuden takia. Tämän vuoksi tietokoneoppimiseen nojaavia, muun muassa Markovin piilomalleja hyödyntäviä menetelmiä, kuten

HMMER-työkaluja (Finn *et al.* 2011) oltaisi voitu harkita vaihtoehtoina BLAST-menetelmille tässäkin työssä.

Päätökset tässä työssä käytettävistä menetelmistä ja tietokannoista tehtiin työn suunnitteluvaiheessa. Näin ollen edellä esitettyjä työn tulosten perusteella syntyneitä ajatuksia vaihtoehtoisten tapojen soveltamista ei tämän Pro gradu -työn rajatun ajan puitteissa ollut mahdollista hyödyntää.

Lyhyiden lukusekvenssien sekvensointiin perustuvat tekniikat mahdollistivat aikoinaan sekvensoinnin hinnan dramaattisen laskun, ja näin menetelmän laajemman saatavuuden (Goldstein *et al.*, 2019). Ne erottuvat edukseen pitkiin lukusekvensseihin perustuvista tekniikoista lukusekvenssien alhaisen virhetason puolesta (Goldstein *et al.*, 2019). Kuitenkin plasmidisekvensseissä esiintyvän suuren vaihtelevuuden vuoksi plasmidien varma erottaminen lyhyisiin lukusekvensseihin nojaavia sekvensointitekniikoita hyödyntämällä on mahdotonta (Arredondo-Alonso *et al.*, 2017). Pitkiä lukusekvenssejä tuottavat sekvensointitekniikat mahdollistavat plasmidien luotettavamman koonnin, ja soveltuvat näin ollen plasmidisekvenssien ja esimerkiksi niissä esiintyvien resistenssigeenien tarkasteluun keskittyvään tutkimukseen paremmin (Goldstein *et al.*, 2019). Toistaiseksi näiden tekniikoiden laajempaa hyödyntämistä on rajoittanut muun muassa korkea hinta. Kuitenkin niin kutsuttujen kolmannen sukupolven sekvensointimenetelmien edustajista erityisesti Oxford Nanopore MinION -sekvensointia pidetään esimerkkinä sekvensointimenetelmien lisääntyvän saatavuuden mahdollistajana (Goldstein *et al.*, 2019).

MinION-laite on pieni USB-liittimellä tietokoneeseen yhdistettävä sekvensointi-instrumentti (Leggett ja Clark 2017). Tämä tekee sen ketterän käytön mahdolliseksi kliinisissä laboratorioissa tai esimerkiksi vaativissa, resurssirajoitteisissa ympäristöissä. Osoituksena tästä menetelmä on muun muassa mahdollistanut Ebola-viruksen reaaliaikaisen seurantajärjestelmän pystyttämisen ja ylläpidon Länsi-Afrikassa (Quick *et al.*, 2016), mikä herättää ajatuksia menetelmän hyödynnettävyydestä myös esimerkiksi antibioottiresistenssin seurannassa näissä kohteissa. Kuten kaikkien pitkiä lukusekvenssejä tuottavien sekvensointimenetelmien kohdalla, myös MinION-tekniikan heikkouksiin lukeutuu lukusekvenssien verrattain heikko laatu, sekä näiden heikkolaatuisten lukusekvenssien epätasainen jakautuminen, minkä vuoksi lukusyvyyden lisääminen ei korjaa heikon laadun tuomaa epävarmuutta (Goldstein *et al.*, 2019). Toistaiseksi lopputuloksen luotettavuutta voidaan lisätä hyödyntämällä MinION-tekniikalla sekvensoitujen genomien koonnissa lisäksi esimerkiksi Illumina-sekvensoinnin tuottamia lyhyitä lukusekvenssejä (Goldstein *et al.*, 2019).

## 15. Liitteet

Liite S1. Eettinen lausunto, Burkina Faso: AMRIWA ethics committee approval BF

Liite S2. Eettinen lausunto, Mali: AMRIWA ethics committee approval Mali

Liite 3. Valmistetut kasvatusalustat

Liite 4. Komentorivillä ajetet komennot

Liite 5. Pangenomin muodostamisessa ja virulenssigeenien vertailussa käytetyt genomisekvenssit

Liite 6. Tilastolliset analyysit

Liite 7. Fenotyyppityksen tulokset

Liite 8. Resistenssiprofiilien vertailu

## 16. Kiitokset

Tahdon osoittaa lämpimät kiitokseni ohjaajilleni Katariina Pärnäselle, Kaisa Haukalle ja Marko Virralle sekä koko MEB-tutkimusryhmälle saamastani tuesta ja rohkaisusta gradutyön aikana. Olen kiitollinen siitä kuinka valtavasti olen saanut oppia ryhmässä työskentelyn aikana. Näytteiden keruusta sekä esikäsittelystä kiitän Anniina Sarekoskea sekä kaikkia yhteistyökumppaneita Burkina Fasossa ja Malissa. Lisäksi kiitän sekvensoinnin toteuttamisesta vastannutta Lars Paulinia Biotekniikan instituutissa sekä Thomas Grönthalia MALDI-TOF-laitteen käytön mahdollistamisesta.

Kiitos henkisestä tuesta Seppo-kissa ja muu perhe.

## 17. Kirjallisuus

- Abraham, EP, ja Newton, GG. 1961. The structure of cephalosporin C. *The Biochemical Journal* 79 (2): 377–93. doi:10.1042/bj0790377.
- Akyar, I, Kaya Ayas, M, ja Karatuna, O. 2019. Performance evaluation of MALDI-TOF MS MBT STAR-BL versus in-house Carba NP testing for the rapid detection of carbapenemase activity in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Microbial Drug Resistance* 25 (7). doi:10.1089/mdr.2018.0355.
- Alghoribi, MF, Gibreel, TM, Farnham, G, Johani, SM Al, Balkhy, HH, ja Upton, M. 2015. Antibiotic-resistant ST38, ST131 and ST405 strains are the leading uropathogenic *Escherichia coli* clones in Riyadh, Saudi Arabia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (10): 2757–2762. doi:10.1093/jac/dkv188.
- Alonso, CA, Zarazaga, M, Sallem, R Ben, Jouini, A, Slama, K Ben, ja Torres, C. 2017. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* in husbandry animals: the African perspective. *Letters in Applied Microbiology* 64 (5). Blackwell Publishing Ltd: 318–34. doi:10.1111/lam.12724.
- Alouache, S, Estepa, V, Messai, Y, Ruiz, E, Torres, C, ja Bakour, R. 2014. Characterization of ESBLs and associated quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from an urban wastewater treatment plant in Algeria. *Microbial Drug Resistance* 20 (1): 30–38. doi:10.1089/mdr.2012.0264.
- Amador, P, Fernandes, R, Prudêncio, C, ja Duarte, I. 2019. Prevalence of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant Enterobacteriaceae on portuguese livestock manure. *Antibiotics* 13 (1). doi:10.3390/antibiotics8010023.
- Ambler, RP. 1980. The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 289 (1036). England: 321–31. doi:10.1098/rstb.1980.0049.
- Anand Paramadhas, BD, Tiroyakgosi, C, Mpinda-Joseph, P, Morokotso, M, Matome, M, Sinkala, F, Gaolebe, M, Malone, B, Molosiwa, E, Guhan Shanmugam, M, Pearl Raseathloho, G, Masilo, J, Oyeniran, Y, Marumoloa, S, Glory Maakelo, O, Katjakae, I, Kgatlwane, J, Godman, B, Massele, A, ja Anand Paramadhas, D. 2019. Point prevalence study of antimicrobial use among hospitals across Botswana; findings and implications. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 17 (7): 1478–7210. doi:10.1080/14787210.2019.1629288.
- Andrews, S. 2010. FastQC A quality control tool for high throughput sequence data <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Arredondo-Alonso, S, Willems, RJ, Schaik, W Van, ja Schürch, AC. 2017. On the (im)possibility of reconstructing plasmids from whole-genome short-read sequencing data. *Letters in Applied Microbiology* 64: 318–34. doi:10.1099/mgen.0.000128.
- Asnicar, F, Manara, S, Zolfo, M, Truong, DT, Scholz, M, Armanini, F, Ferretti, P, Gorfer, V, Pedrotti, A, Tett, A, Segata, N, Provinciale, A, ja Sanitari, S. 2017. Studying vertical microbiome transmission from mothers to infants by strain-level metagenomic profiling characterizing the flow of bacterial strains from mother to infants with shotgun metagenomics. *mSystems* 2 (1): 164–80. doi:10.1128/mSystems.00164-16.
- Aubert, D, Naas, T, Héritier, C, Poirel, L, ja Nordmann, P. 2006. Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of  $\beta$ -Lactam resistance genes. *Journal of Bacteriology* 188 (18): 6506–14. doi:10.1128/JB.00375-06.

- Bachman, MA, Miller, VL, ja Weiser, JN. 2009. Mucosal lipocalin 2 has pro-inflammatory and iron-sequestering effects in response to bacterial enterobactin. *PLOS Pathogens* 5 (10): e000622. doi:10.1371/journal.ppat.1000622.
- Balloux, F, Brynildsrud, OB, Dorp, L Van, Shaw, LP, Chen, H, Harris, KA, Wang, H, ja Eldholm, V. 2018. From theory to practice: translating whole-genome sequencing (WGS) into the clinic. *Trends in Microbiology* 26 (12): 1035–48. doi:10.1016/j.tim.2018.08.004.
- Baraniak, A, Izdebski, R, Fiett, J, Sadowy, E, Adler, A, Kasma, M, Salomon, J, Lawrence, C, Rossini, A, Salvia, A, Samso, JV, Fierro, J, Paul, M, Lerman, Y, Malhotra-Kumar, S, Lammens, C, Goossens, H, Hryniewicz, W, Brun-Buisson, C, Carmeli, Y, ja Gniadkowski, M. 2013. Comparative population analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum-lactamases colonizing patients in rehabilitation centers in four countries on behalf of the MOSAR WP2 and WP5 study groups. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (4): 1992–97. doi:10.1128/AAC.02571-12.
- Bauernfeind, A, Chong, Y, ja Schweighart, S. 1989. Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* 17 (5). Germany: 316–21. doi:10.1007/bf01650718.
- Bialek-Davenet, S, Criscuolo, A, Ailloud, F, Passet, V, Jones, L, Delannoy-Vieillard, AS, Garin, B, Hello, S, Le, Arlet, G, Nicolas-Chanoine, MH, Decré, D, ja Brisse, S. 2014. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerging Infectious Diseases* 20 (11). Centers for Disease Control and Prevention (CDC): 1812–20. doi:10.3201/eid2011.140206.
- Birnbaum, J, Kahan, FM, Helmut Kropp, M, ja Macdonald, JS. 1985. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics discovery and development of imipenem/cilastatin. *American Journal of Microbiology* 78 (6A): 3–21. doi:10.1016/0002-9343(85)90097-x.
- Bradford, PA. 2001. Extended-spectrum-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology reviews* 14 (4): 933–51. doi:10.1128/CMR.14.4.933-951.2001.
- Bulabula, ANH, Dramowski, A, ja Mehtar, S. 2017. Maternal colonization or infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Africa: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases* 64: 58–66. doi:10.1016/j.ijid.2017.08.015.
- Burkhard, KA, ja Wilks, A. 2007. Characterization of the outer membrane receptor ShuA from the heme uptake system of *Shigella dysenteriae*: Substrate specificity and identification of the heme protein ligands. *Journal of Biological Chemistry* 282 (20): 15126–36. doi:10.1074/jbc.M611121200.
- Bush, K, ja Jacoby, GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54 (3). American Society for Microbiology (ASM): 969–76. doi:10.1128/AAC.01009-09.
- Bush, K, Jacoby, GA, ja Medeiros, AA. 1995. MINIREVIEW A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 39 (6): 1211–33. doi:10.1016/j.ijid.2017.08.015.
- Camacho, C, Coulouris, G, Avagyan, V, Ma, N, Papadopoulos, J, Bealer, K, ja Madden, TL. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10: 421. doi:10.1186/1471-2105-10-421.
- Cantón, R, ja Coque, TM. 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology* 9: 466–75. doi:10.1016/j.mib.2006.08.011.
- Cantón, R, María González-Alba, J, Galán, JC, ja Stefani, S. 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology* 3: 110. doi:10.3389/fmicb.2012.00110.
- Cantón, R, Morosini, MI, Martin, O, la Maza, S de, ja la Pedrosa, EGG de. 2008. IRT and CMT  $\beta$ -lactamases and inhibitor resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 14: 53–62. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01849.x.

- Carattoli, A. 2009. MINIREVIEW Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (6): 2227–38. doi:10.1128/AAC.01707-08.
- Carattoli, A, Zankari, E, García-Fernández, A, Larsen, MV, Lund, O, Villa, L, Aarestrup, FM, ja Hasman, H. 2014. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (7): 895–3903. doi:10.1128/AAC.02412-14.
- Carbonnelle, E, Mesquita, C, Bille, E, Day, N, Dauphin, B, Beretti, J-L, Ferroni, A, Gutmann, L, ja Nassif, X. 2010. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017.
- Chattaway, MA, Jenkins, C, Ciesielczuk, H, Day, M, DoNascimento, V, Day, M, Rodriguez, I, Essen-Zandbergen, A van, Schink, A-K, Wu, G, Threlfall, J, Woodward, MJ, Coldham, N, Kadlec, K, Schwarz, S, Dierikx, C, Guerra, B, Helmuth, R, Mevius, D, Woodford, N, ja Wain, J. 2014. Evidence of evolving extraintestinal enteroaggregative Escherichia coli ST38 clone. *Emerging Infectious Diseases* 20 (11). United States: 1935–37. doi:10.3201/eid2011.131845.
- Chen, L, Yang, J, Yu, J, Yao, Z, Sun, L, Shen, Y, ja Jin, Q. 2005. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research* 33 (Database issue D325–D328). doi:10.1093/nar/gki008.
- Chereau, F, Herindrainy, P, Garin, B, Huynh, B-T, Randrianirina, F, Padget, M, Piola, P, Guillemot, D, ja Delarocque-Astagneau, E. 2015. Colonization of extended-spectrum-lactamase-and NDM-1-producing Enterobacteriaceae among pregnant women in the community in a low-income country: a potential reservoir for transmission of multiresistant Enterobacteriaceae to neonates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (6): 3652–55. doi:10.1128/AAC.00029-15.
- CLSI. 2019. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100 (ISBN 978-1-68440-032-4 [Print]; ISBN 978-1-68440-033-1 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Inst. www.clsi.org.
- Cornaglia, G, Mazzariol, A, Lauretti, L, Rossolini, GM, ja Fontana, R. 2000. Hospital outbreak of carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosa producing VIM-1, a novel transferable metallo- $\beta$ -lactamase. *Clinical Infectious Diseases* 31: 1119–44. <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/31/5/1119/327094>.
- Correa-Martínez, CL, Idelevich, EA, Sparbier, K, Kostrzewa, M, ja Becker, K. 2019. Rapid Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) and AmpC  $\beta$ -lactamases in Enterobacterales: Development of a screening panel using the MALDI-TOF MS-based direct-on-target microdroplet growth assay. *Frontiers in Microbiology* 10 (JAN). Frontiers Media S.A. doi:10.3389/fmicb.2019.00013.
- Coudron, PE, Moland, ES, ja Thomson, KS. 2000. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Proteus mirabilis isolates at a Veterans Medical Center. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (5): 1791–96. <http://jcm.asm.org/>.
- Croxen, MA, ja Finlay, BB. 2010. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* 8: 26–38. doi:10.1038/nrmicro2265.
- Datta, N, Dacey, S, Hughes, V, Knight, S, Richards, H, Williams, G, Casewell, M, ja Shannon, KP. 1980. Distribution of genes for trimethoprim and gentamicin resistance in bacteria and their plasmids in a general hospital. *Journal of General Microbiology* 118 (2). England: 495–508. doi:10.1099/00221287-118-2-495.
- Delmont, TO, Eren, AM, ja Murat Eren, A. 2018. Linking pangenomes and metagenomes: the Prochlorococcus metapangenome. *PeerJ* 6: e4320. doi:10.7717/peerj.4320.
- Denton, M, ja Kerr, KG. 1998. Microbiological and clinical aspects of infection associated with Stenotrophomonas maltophilia. Vsk. 11. <http://cmr.asm.org/>.
- Dogra, S, Sakwinska, O, Soh, S-E, Ngom-Bru, C, Brück, WM, Berger, B, Brüßow, H, Seng Lee, Y, Yap, F, Chong, Y-S, Godfrey, KM, Holbrook, JD, ja Dogra, CS. 2015. Dynamics of infant gut microbiota are

influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent adiposity on behalf of the GUSTO study group. *mBio* 6 (1): e02419-14. doi:10.1128/mBio.02419-14.

- Doménech-Sánchez, A, Hernández-Allés, S, Martínez-Martínez, L, Benedí, VJ, ja Albertí, S. 1999. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in beta-lactam antibiotic resistance. *Journal of bacteriology* 181 (9). American Society for Microbiology Journals: 2726–32. doi:0021-9193/99/\$04.001 0.
- Domingues, S, Harms, K, Fricke, WF, Johnsen, PJ, ja Silva, D. 2012. Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species. *PLoS Pathog* 8 (8): 1002837. doi:10.1371/journal.ppat.1002837.
- Domínguez-Herrera, J, Velasco, C, Docobo-Pérez, F, Rodríguez-Martínez, JM, Ló Pez-Rojas, R, Briales, A, Pichardo, C, Díaz-De-Alba, P, Rodríguez-Bañ O, J, Pascual, A, ja Pachó, J. 2013. Impact of qnrA1, qnrB1 and qnrS1 on the efficacy of ciprofloxacin and levofloxacin in an experimental pneumonia model caused by *Escherichia coli* with or without the GyrA mutation Ser83Leu. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68: 1609–1615. doi:10.1093/jac/dkt063.
- Dong, N, Lin, D, Zhang, R, Wai-Chi Chan, E, ja Chen, S. 2018. Carriage of bla KPC-2 by a virulence plasmid in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73: 3317–3321. doi:10.1093/jac/dky358.
- Dossim, S, Bonnin, RA, Salou, M, Tanga, K, Godonou, V, Dagnra, AY, Prince David, M, Naas, T, ja Dortet, L. 2019. Occurrence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Togo, West Africa. *International Journal of Antimicrobial Agents* 53 (4). Elsevier: 530–32. doi:10.1016/J.IJANTIMICAG.2018.11.019.
- Doyle, RM, O’sullivan, DM, Aller, SD, Bruchmann, S, Clark, T, Pelegrin, AC, Cormican, M, Benavente, ED, Ellington, MJ, Mcgrath, E, Motro, Y, Phuong, T, Nguyen, T, Phelan, J, Shaw, LP, Stabler, RA, Belkum, A Van, Dorp, L Van, Woodford, N, Moran-Gilad, J, Huggett, JF, ja Harris, KA. 2019. Discordant bioinformatic predictions of antimicrobial resistance from whole-genome sequencing data of bacterial isolates: An inter-laboratory study. *bioRxiv*. doi:10.1101/793885.
- Dozois, CM, Curtiss, R, ja Dozois Roy Curtiss III, CM. 1999. Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of “exotic” islands in the gene stream. *Veterinary Research* 30 (3): 157–79. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00902564>.
- Durrant, MG, Li, MM, Siranosian, B, ja Bhatt, AS. 2019. Mobile genetic element insertions drive antibiotic 1 resistance across pathogens 2. *bioRxiv*. doi:10.1101/527788.
- Ellington, MJ, Ekelund, O, Aarestrup, FM, Canton, R, Doumith, M, Giske, C, Grundman, H, Hasman, H, Holden, MTG, Hopkins, KL, Iredell, J, Kahlmeter, G, Oser, CUK€, Macgowan, A, Mevius, D, Mulvey, M, Naas, T, Peto, T, Rolain, J-M, Samuelsen, Ø, ja Woodford, N. 2017. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Journal of Infection and Public Health* 11 (6): 784–87. doi:10.1016/j.cmi.2016.11.012.
- Eren, AM, Esen, ÖC, Quince, C, Vineis, JH, Morrison, HG, Sogin, ML, ja Delmont, TO. 2015. Anvi’o: an advanced analysis and visualization platform for ‘omics data. *PeerJ* 3. PeerJ Inc.: e1319. doi:10.7717/peerj.1319.
- EUCAST. 2019a. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Versio 9.0. 2019. <http://www.eucast.org>.
- . 2019b. EUCAST disk diffusion test manual. 2019. [www.eucast.org](http://www.eucast.org).
- . 2019c. Expert rules for Enterobacterales V3.2\_2019. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Expert\\_Rules/2019/Enterobacterales\\_ExpertRules\\_V3.2\\_20190613.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/2019/Enterobacterales_ExpertRules_V3.2_20190613.pdf).
- . 2019d. Expert rules for intrinsic resistance v.3.2. 6/2019.

[http://www.eucast.org/expert\\_rules\\_and\\_intrinsic\\_resistance/](http://www.eucast.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/).

- Evrard, B, Balestrino, D, Dosgilbert, A, Bouya-Gachancard, JLJ, Charbonnel, N, Forestier, C, ja Tridon, A. 2010. Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity* 78 (1): 210–19. doi:10.1128/IAI.00864-09.
- Fang, C-T, Lai, S-Y, Yi, W-C, Hsueh, P-R, Liu, K-L, ja Chang, S-C. 2007. *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: An emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. *Clinical Infectious Diseases* 45 (3): 284–293. doi:10.1086/519262.
- Finn, RD, Clements, J, ja Eddy, SR. 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Research* 39: W29–W37. doi:10.1093/nar/gkr367.
- Ford, PJ, ja Avison, MB. 2004. Evolutionary mapping of the SHV  $\beta$ -lactamase and evidence for two separate IS26-dependent blaSHV mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54 (1). Oxford University Press: 69–75. doi:10.1093/jac/dkh251.
- Frost, LS, Leplae, R, Summers, AO, ja Toussaint, A. 2005. Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology* 3 (9): 722–32. doi:10.1038/nrmicro1235.
- Gasparrini, AJ, Wang, B, Sun, X, Kennedy, EA, Hernandez-Leyva, A, Ndao, IM, Tarr, PI, Warner, BB, ja Dantas, G. 2019. Persistent metagenomic signatures of early-life hospitalization and antibiotic treatment in the infant gut microbiota and resistome. *Nature Microbiology* 4 (syyskuuta). Springer Science and Business Media LLC: 2285–2297. doi:10.1038/s41564-019-0550-2.
- Gerlach, GF, Allen, BL, ja Clegg, S. 1988. Molecular characterization of the type 3 (MR/K) fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* 170 (8): 3547–53. doi:10.1128/jb.170.8.3547-3553.1988.
- Glansdorff, N, Charlier, D, ja Zafarullah, M. 1981. Activation of gene expression by IS2 and IS3. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 45 Pt 1. United States: 153–56. doi:10.1101/sqb.1981.045.01.024.
- Goldstein, S, Beka, L, Graf, J, ja Klassen, JL. 2019. Evaluation of strategies for the assembly of diverse bacterial genomes using MinION long-read sequencing. *BMC Genomics* 20: 23. doi:10.1186/s12864-018-5381-7.
- Gorrie, CL, Mirčeta, M, Wick, RR, Edwards, DJ, Thomson, NR, Strugnell, RA, Pratt, NF, Garlick, JS, Watson, KM, Pilcher, D V, Mcgloughlin, SA, Spelman, DW, Jenney, AWJ, ja Holt, KE. 2017. Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. *Clinical Infectious Diseases* ® 208 (2): 208–15. doi:10.1093/cid/cix270.
- Gröbner, S, Linke, D, Schütz, W, Fladerer, C, Madlung, J, Autenrieth, IB, Witte, W, ja Pfeifer, Y. 2009. Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. *Journal of Medical Microbiology* 58: 912–922. doi:10.1099/jmm.0.005850-0.
- Guenther, S, Semmler, T, Stubbe, A, Stubbe, M, Wieler, LH, ja Schaufler, K. 2017. Chromosomally encoded ESBL genes in *Escherichia coli* of ST38 from Mongolian wild birds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (5): 1310–13. doi:10.1093/jac/dkx006.
- Hendriksen, RS, Munk, P, Njage, P, Bunnik, B van, McNally, L, Lukjancenko, O, Röder, T, Nieuwenhuijse, D, Pedersen, SK, Kjeldgaard, J, Kaas, RS, Clausen, PTL, Vogt, JK, Leekitcharoenphon, P, Schans, MGM van de, Zuidema, T, Roda Husman, AM de, Rasmussen, S, Petersen, B, Amid, C, Cochrane, G, Sicheritz-Ponten, T, Schmitt, H, Alvarez, JRM, Aidara-Kane, A, Pamp, SJ, Lund, O, Hald, T, Woolhouse, M, Koopmans, MP, Vigre, H, Petersen, TN, ja Aarestrup, FM. 2019. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nature Communications* 10 (1). Nature Publishing Group: 1124. doi:10.1038/s41467-019-08853-3.



- Hennequin, C, ja Forestier, C. 2007. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. *Research in Microbiology* 158 (4). Elsevier Masson: 339–47. doi:10.1016/J.RESMIC.2007.02.005.
- Holt, KE, Wertheim, H, Zadoks, RN, Baker, S, Whitehouse, CA, Dance, D, Jenney, A, Connor, TR, Yang Hsu, L, Severin, J, Brisse, S, Cao, H, Wilksch, J, Gorrie, C, Schultz, MB, Edwards, DJ, Nguyen, K Van, Vu Nguyen, T, Tuyet Dao, T, Mensink, M, Minh, V Le, Thi Khanh Nhu, N, Schultsz, C, Kuntaman, K, Newton, PN, Moore, CE, Strugnell, RA, Thomson, NR, Baker, S, ja Brisse, S. 2015. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, E3574–E358. doi:10.1073/pnas.1501049112.
- Huang, L, Hu, YY, ja Zhang, R. 2017. Prevalence of fosfomycin resistance and plasmid-mediated fosfomycin-modifying enzymes among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Zhejiang, China. *Journal of Medical Microbiology* 66: 1332– 1334. doi:10.1099/jmm.0.000578.
- Huang, W, Wang, G, Sebra, R, Zhuge, J, Yin, C, Agüero-Rosenfeld, ME, Schuetz, AN, Dimitrova, N, ja Fallon, JT. 2017. Emergence and evolution of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* with both bla KPC and bla CTX-M integrated in the chromosome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (7). doi:10.1128/AAC.00076-17.
- Humeniuk, C, Arlet, G, Gautier, V, Grimont, P, Labia, R, ja Philippon, A. 2002. Lactamases of *Kluyvera ascorbata*, Probable Progenitors of Some Plasmid-Encoded CTX-M Types. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 46 (9): 3045–49. doi:10.1128/AAC.46.9.3045-3049.2002.
- Hyatt, D, Chen, G-L, Locascio, PF, Land, ML, Larimer, FW, ja Hauser, LJ. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics* 11. BioMed Central: 119. doi:10.1186/1471-2105-11-119.
- Iqbal, J, Dufendach, KR, Wellons, JC, Kuba, MG, Nickols, HH, Gómez-Duarte, OG, ja Wynn, JL. 2016. Lethal neonatal meningoencephalitis caused by multi-drug resistant, highly virulent *Escherichia coli*. *Infectious Diseases* 48 (6): 461–66. doi:10.3109/23744235.2016.1144142.
- Jia, B, Raphenya, AR, Alcock, B, Wagglechner, N, Guo, P, Tsang, KK, Lago, BA, Dave, BM, Pereira, S, Sharma, AN, Doshi, S, Courtot, M, Lo, R, Williams, LE, Frye, JG, Elsayegh, T, Sardar, D, Westman, EL, Pawlowski, AC, Johnson, TA, Brinkman, FSL, Wright, GD, ja McArthur, AG. 2017. CARD 2017: Expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research* 45 (D1). Oxford University Press: D566–73. doi:10.1093/nar/gkw1004.
- Joensen, KG, Tetzschner, AMM, Iguchi, A, Aarestrup, FM, ja Scheut, F. 2015. Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *Journal of Clinical Microbiology* 53: 2410–26. doi:10.1128/JCM.00008-15.
- Johnson, TJ, Wannemuehler, Y, Johnson, SJ, Stell, AL, Doetkott, C, Johnson, JR, Kim, KS, Spanjaard, L, ja Nolan, LK. 2008. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (22): 7043–50. doi:10.1128/AEM.01395-08.
- Kallonen, T, ja Boinett, CJ. 2016. Genome watch: EPEC: A cocktail of virulence. *Nature Reviews Microbiology* 14 (4): 196. doi:10.1038/nrmicro.2016.33.
- Kaper, JB, Nataro, JP, ja Mobley, HLT. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2: 3. doi:10.1038/nrmicro818.
- Kim, H Bin, Wang, M, Park, CH, Kim, E-C, Jacoby, GA, ja Hooper, DC. 2009. OqxAB encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (8): 3582–84. doi:10.1128/AAC.01574-08.
- Kim, KS, Itabashi, H, Gemski, P, Sadoff, J, Warren, RL, ja Cross, AS. 1992. The K1 capsule is the critical determinant in the development of *Escherichia coli* meningitis in the rat. *Journal of Clinical*

*Investigation* 90 (3). The American Society for Clinical Investigation: 897–905.  
doi:10.1172/JCI115965.

- Kitchel, B, Rasheed, JK, Patel, JB, Srinivasan, A, Navon-Venezia, S, Carmeli, Y, Brolund, A, ja Giske, CG. 2009. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (8): 3365–70. doi:10.1128/AAC.00126-09.
- Korhonen, TK, Valtonen, M V, Parkkinen, J, Vaisanen-Rhen, V, Finne, J, Orskov, F, Orskov, I, Svenson, SB, ja Makelä, APH. 1985. Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infection and Immunity*, 486–91.  
<http://iai.asm.org/>.
- Köser, CU, Ellington, MJ, Cartwright, EJP, Gillespie, SH, Brown, NM, Farrington, M, Holden, MTG, Dougan, G, Bentley, SD, Parkhill, J, ja Peacock, SJ. 2012. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLOS Pathogens* 8 (8): e002824.  
doi:10.1371/journal.ppat.1002824.
- Kregten, E Van, Westerdaal, NAC, ja Willers, JMN. 1984. New, simple medium for selective recovery of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* from human feces culture media. *Journal of Clinical Microbiology* 20 (5): 936–41.
- Lankoandé, M, Bonkougou, P, Simporé, A, Somda, G, ja Kabore, RAF. 2018. Inhospital outcome of elderly patients in an intensive care unit in a Sub-Saharan hospital. *BMC Anesthesiology* 18: 118.  
doi:10.1186/s12871-018-0581-x.
- Larsen, M V, Cosentino, S, Rasmussen, S, Friis, C, Hasman, H, Lykke, R, Jelsbak, L, Sicheritz-Pontén, T, Ussery, DW, Aarestrup, FM, ja Lund, O. 2012. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. doi:10.1128/JCM.06094-11.
- Lartigue, MF, Poirel, L, Aubert, D, ja Nordmann, P. 2006. In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring  $\beta$ -lactamase gene blaCTX-M of *Kluyvema ascorbata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (4): 1282–86. doi:10.1128/AAC.50.4.1282-1286.2006.
- Lawlor, MS, O’connor, C, ja Miller, VL. 2007. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Infection and Immunity* 75 (3): 1463–72.  
doi:10.1128/IAI.00372-06.
- Leggett, RM, ja Clark, MD. 2017. A world of opportunities with nanopore sequencing. *Journal of Experimental Botany* 68 (20): 5419–5429. doi:10.1093/jxb/erx289.
- Liu, Y-C, Cheng, D-L, ja Lin, C-L. 1986. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. *Archives of Internal Medicine* 146 (10): 1913–16.  
doi:10.1001/archinte.1986.00360220057011.
- Llarena, A-K, Silva, DN, ja Machado, MP. 2018. INNUENDO: A cross-sectoral platform for the integration of genomics in the surveillance of food-borne pathogens. *EFSA supporting publication 2018:EN-1498.142*. doi:10.2903/sp.efsa.2018.EN-1498.
- Llobet, E, Tomás, JM, Bengoechea, JA, ja Bengoechea, JA. 2008. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology* 154: 3877–3886. doi:10.1099/mic.0.2008/022301-0.
- Logue, CM, Doetkott, C, Mangiamale, P, Wannemuehler, YM, Johnson, TJ, Tivendale, KA, Li, G, Sherwood, JS, ja Nolan, LK. 2012. Genotypic and phenotypic traits that distinguish neonatal meningitis-associated *Escherichia coli* from fecal *E. coli* isolates of healthy human hosts. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (16): 5824. doi:10.1128/AEM.07869-11.
- Lomovskaya, O, Lewis, K, ja Matin, A. 1995. EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. *Journal of Bacteriology* 177 (9): 2328–34. <http://jb.asm.org/>.

- Machado, MP, Halkilahti, P, Jaakkonen, A, Silva, DN, Mendes, I, Nalbantoglu, Y, Borges, V, Ramirez, M, Rossi, M, CJ. 2017. INNUca GitHub <https://github.com/B-UMMI/INNUca>.
- Magiorakos, A-P, Srinivasan, A, Carey, RB, Carmeli, Y, Falagas, ME, Giske, CG, Harbarth, S, Hindler, JF, Kahlmeter, G, Olsson-Liljequist, B, Paterson, DL, Rice, LB, Stelling, J, Struelens, MJ, Vatopoulos, A, Weber, JT, ja Monnet, DL. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 18: 268–81. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Mäkinen, V, Salmela, L, ja Ylinen, J. 2012. Normalized N50 assembly metric using gap-restricted co-linear chaining. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/13/255><http://www.cs.helsinki.fi/group/scaffold/normalizedN50/.Background>.
- Manenzhe, RI, Zar, HJ, Nicol, MP, ja Kaba, M. 2015. The spread of carbapenemase-producing bacteria in Africa: a systematic review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70: 23–40. doi:10.1093/jac/dku356.
- Marando, R, Seni, J, Mirambo, MM, Falgenhauer, L, Moremi, N, Mushi, MF, Kayange, N, Manyama, F, Chakraborty, T, ja Mshana, SE. 2018. Predictors of the extended-spectrum-beta lactamases producing Enterobacteriaceae neonatal sepsis at a tertiary hospital, Tanzania. *Journal of Medical Microbiology* 308: 803–11. doi:10.1016/j.jjmm.2018.06.012.
- Marcel, M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17 (1): 10–12. doi:<http://dx.doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
- Martinez-Martinez, L, Cantón Spain, R, Stefani, S, Skov, R, Glupczynski, Y, Nordmann, P, Wootton, M, Miriagou, V, ja Skov Simonsen, G. 2017. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Versio 2.0/2017. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_170711.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf).
- Matsumura, Y, Tanaka, M, Yamamoto, M, Nagao, M, Machida, K, Ito, Y, Takakura, S, Ogawa, K, Yoshizawa, A, Fujimoto, Y, Okamoto, S, Uemoto, S, ja Ichiyama, S. 2015. High prevalence of carbapenem resistance among plasmid-mediated AmpC-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* during outbreaks in liver transplantation units. *International Journal of Antimicrobial Agents* 45: 33–40. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.08.015.
- Matuschek, E, Brown, DFJ, ja Kahlmeter, G. 2014. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* 20 (4): O255–O266. doi:10.1111/1469-0691.12373.
- Mikheenko, A, Prjibelski, A, Saveliev, V, Antipov, D, ja Gurevich, A. 2018. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics*, i142–i150. doi:10.1093/bioinformatics/bty266.
- Minogue, TD, Daligault, HA, Davenport, KW, Bishop-Lilly, KA, Broomall, SM, Bruce, DC, Chain, PS, Chertkov, O, Coyne, SR, Freitas, T, Frey, KG, Gibbons, HS, Jaissle, J, Redden, CL, Rosenzweig, CN, Xu, Y, ja Johnson, SL. 2014. Complete genome assembly of *Escherichia coli* ATCC 25922, a serotype O6 reference strain. *Genome Announcements* 2 (5): e00969-14. doi:10.1128/genomeA.00969-14.
- Miro, E, Cuerpo, M del, Navarro, F, Sabate, M, Mirelis, B, ja Prats, G. 1998. Emergence of clinical *Escherichia coli* isolates with decreased susceptibility to ceftazidime and synergic effect with co-amoxiclav due to SHV-1 hyperproduction. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 42 (4). England: 535–38. doi:10.1093/jac/42.4.535.
- Moore, AM, Ahmadi, S, Patel, S, Gibson, MK, Wang, B, Ndao, MI, Deych, E, Shannon, W, Tarr, PI, Warner, BB, ja Dantas, G. 2015. Gut resistome development in healthy twin pairs in the first year of life. *Microbiome* 3 (27). doi:10.1186/s40168-015-0090-9.
- Morosini, M-I, García-Castillo, M, Coque, TM, Valverde, A, Ngela Novais, A<sup>^</sup>, Loza, E, Baquero, F, ja

- Cantón, R. 2006. Antibiotic coresistance in extended-spectrum-lactamase-producing Enterobacteriaceae and in vitro activity of tigecycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (8): 2695–99. doi:10.1128/AAC.00155-06.
- Murono, K, Yoshikawa, M, Saijo, M, Inyaku, F, Kakehashi, H, ja Tsukamoto, T. 1993. Acquisition of nonmaternal Enterobacteriaceae by infants in hospitals delivered. *Journal of Pediatrics* 122 (1): 120–25.
- Navon-Venezia, S, Kondratyeva, K, ja Carattoli, A. 2017. Klebsiella pneumoniae: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews* 013: 252–75. doi:10.1093/femsre/fux013.
- Nicholson, BA, West, AC, Mangiamale, P, Barbieri, N, Wannemuehler, Y, Nolan, LK, Logue, CM, ja Li, G. 2016. Genetic characterization of ExPEC-like virulence plasmids among a subset of NMEC. *PLoS ONE* 11 (1): e0147757. doi:10.1371/journal.pone.0147757.
- Nikaido, H, ja Takatsuka, Y. 2008. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *BBA - Proteins and Proteomics* 1794: 769–81. doi:10.1016/j.bbapap.2008.10.004.
- Nordmann, P, Naas, T, ja Poirel, L. 2011. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*. doi:10.3201/eid1710.110655.
- Oksanen, J, Blanchet, G, Friendly, M, Kindt, R, Legendre, P, McGlinn, D, Minchin, PR, O'Hara, RB, Simpson, GL, Solymos, P, Stevens, MHM, Szoecs, E, ja Wagner, H. 2019. vegan: Community ecology package. Versio 2.5-6. 2019.
- Osano, E, Arakawa, Y, Wacharotayankun, R, Ohta, M, Horii, T, Ito, H, Yoshimura, F, ja Kato, N. 1994. Molecular characterization of an Enterobacterial metallo 1-lactamase found in a clinical isolate of Serratia marcescens that shows imipenem resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 71–78.
- Ouagadougou population. 2019. <http://worldpopulationreview.com/world-cities/ouagadougou-population/>.
- Ouédraogo, A-S, Sanou, M, Kissou, A, Sanou, S, Solaré, H, Kaboré, F, Poda, A, Aberkane, S, Bouzinbi, N, Sano, I, Nacro, B, Sangaré, L, Carrière, C, Decré, D, Ouégraogo, R, Jean-Pierre, H, ja Godreuil, S. 2016. High prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing enterobacteriaceae among clinical isolates in Burkina Faso. *BMC Infectious Diseases* 16: 326. doi:10.1186/s12879-016-1655-3.
- Ouédraogo, A-S, Sanou, S, Kissou, AE, Poda, A, Aberkane, S, Bouzinbi, N, Nacro, B, Oué, R, Perre, P Van De, Carriere, C, Decré, D, Lè Ne Jean-Pierre, H, ja Godreuil, S. 2017. Fecal carriage of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases in hospitalized patients and healthy community volunteers in Burkina Faso. *Microbial Drug Resistance* 23 (1). doi:10.1089/mdr.2015.0356.
- Padilla, E, Llobet, E, Doménech-Sánchez, A, Martínez-Martínez, L, Bengoechea, JA, ja Albertí, S. 2010. Klebsiella pneumoniae AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (1): 177–83. doi:10.1128/AAC.00715-09.
- Pärnänen, K. 2018. MGE Database. <https://github.com/KatariinaParnanen/MobileGeneticElementDatabase> Versio 1.1.
- Pärnänen, K, Karkman, A, Hultman, J, Lyra, C, Bengtsson-Palme, J, Larsson, DGJ, Rautava, S, Isolauri, E, Salminen, S, Kumar, H, Satokari, R, ja Virta, M. 2018. Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistome and mobile genetic elements. *Nature Communications* 9: 389. doi:10.1038/s41467-018-06393-w.
- Partridge, SR, Kwong, SM, Firth, N, ja Jensen, SO. 2018. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology reviews* 31 (4): e00088-17. doi:10.1128/CMR.00088-17.
- Paterson, DL, ja Bonomo, RA. 2005. Extended-spectrum-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology reviews* 18 (4): 657–86. doi:10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.

- Paul, M, Narendrakumar, L, Vasanthakumary, AR, Joseph, I, ja Thomas, S. 2019. Genome sequence of a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST78 with high colistin resistance isolated from a patient in India. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 17: 187–88. doi:10.1016/j.jgar.2019.04.008.
- Peleg, AY, ja Hooper, DC. 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *The New England Journal of Medicine* 362: 1804–17.
- Philippon, A, Arlet, G, ja Jacoby, GA. 2002. Plasmid-determined AmpC-type-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (1): 1–11. doi:10.1128/AAC.46.1.1-11.2002.
- Pitout, JDD, Nordmann, P, Laupland, KB, ja Poirel, L. 2005. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum b-lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56: 52–59. doi:10.1093/jac/dki166.
- Pitout, JDD, Peirano, G, Kock, MM, Strydom, K-A, ja Matsumura, Y. 2019. The global ascendancy of OXA-48-type carbapenemases. *Clinical Microbiology Reviews* 33 (1): e00102-19. doi:10.1128/CMR.00102-19.
- Poirel, L, Potron, AA, ja Nordmann, P. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (6): 1597–1606. doi:10.1093/jac/dks121.
- Prasadarao, N V, Wass, CA, Weiser, JN, Stins, MF, Huang, S-H, Kwang, A, ja Kim, S. 1996. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity* 64 (1): 146–53.
- Pulzova, L, Navratilova, L, ja Comor, L. 2017. Alterations in outer membrane permeability favor drug-resistant phenotype of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Drug Resistance* 23 (4). doi:10.1089/mdr.2016.0017.
- Qiagen. 2016. Handbook, QIAamp® DNA Mini and Blood Mini: Appendix D: Protocols for Bacteria, Isolation of genomic DNA from bacterial suspension cultures. *Qiagen*. <https://www.qiagen.com/fi/resources/resourcedetail?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>.
- Quick, J, Loman, NJ, Duraffour, S, Simpson, JT, Severi, E, Cowley, L, Akoi bore, J, Koundouno, R, Dudas, G, Mikhail, A, Ouédraogo, N, Afrough, B, Bah, A, J baum, JH, Becker-Ziaja, B, Peter boettcher, J, Cabeza-Cabrero, M, Camino-Sánchez, Á, Carter, LL, Doerrbecker, J, Enkirch, T, García-Dorival, I, Hetzelt, N, Hinzmann, J, Holm, T, Eleni Kafetzopoulou, L, Koropogui, M, Kosgey, A, Kuisma, E, Logue, CH, Mazzarelli, A, Meisel, S, Mertens, M, Michel, J, Ngabo, D, Nitzsche, K, Pallasch, E, Victoria Patrono, L, Portmann, J, Gabriella Repits, J, Rickett, N, Sachse, A, Singethan, K, Vitoriano, I, Yemanaberhan, RL, Zekeng, EG, Racine, T, Bello, A, Alpha Sall, A, Faye, O, Faye, O, Roger, I, Williams, CJ, Yattara, F, Lewandowski, K, Taylor, J, Rachwal, P, Turner, DJ, Pollakis, G, Hiscox, JA, Matthews, DA, O, MK, McD Johnston, A, Wilson, D, Hutley, E, Smit, E, Caro, A Di, Wölfel, R, Stoecker, K, Fleischmann, E, Gabriel, M, Weller, SA, Koivogui, L, Diallo, B, Keita, S, Rambaut, A, Formenty, P, Günther, S, ja Carroll, MW. 2016. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature* 29. doi:10.1038/nature16996.
- Rafaque, Z, Dasti, JI, ja Andrews, SC. 2019. Draft genome sequence of a uropathogenic *Escherichia coli* isolate (ST38 O1:H15) from Pakistan, an emerging multidrug-resistant sequence type with a high virulence profile. *New Microbes and New Infections* 27: 1–2. doi:10.1016/j.nmni.2018.10.004.
- Ramirez, MS, Traglia, GM, Lin, DL, Tran, T, ja Tolmasky, ME. 2014. Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-Negatives: the *Klebsiella pneumoniae* Paradigm. *Microbiology Spectrum* 2 (5): PLAS-0016-2013. doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0016-2013.
- Rasheed, JK, Anderson, GJ, Yigit, H, Queenan, AM, Domé Nech-Sa´nchez, A, Sa´nchez, S, Swenson, JM, Biddle, JW, Ferraro, MJ, Jacoby, GA, ja Tenover, FC. 2000. Characterization of the extended-spectrum-lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (9): 2382–88.

- Rasko, DA, Rosovitz, MJ, Garry, Myers, SA, Mongodin, EF, Fricke, WF, Gajer, P, Crabtree, J, Sebaihia, M, Thomson, NR, Chaudhuri, R, Henderson, IR, Sperandio, V, ja Ravel, J. 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: Comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *Journal of Bacteriology* 190 (20): 6881–93. doi:10.1128/JB.00619-08.
- Rendón, MA, Saldaña, Z, Aysen, A, Erdem, L, Rio Monteiro-Neto, V, Vázquez, A, Kaper, JB, Puente, JL, ja Giró, JA. 2007. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (25): 10637–42. doi:10.1073/pnas.0704104104.
- Reuter, S, Ellington, MJ, Cartwright, EJP, Köser, CU, Török, ME, Gouliouris, T, Harris, SR, Brown, NM, Holden, MTG, Quail, M, Parkhill, J, Smith, GP, Bentley, SD, ja Peacock, SJ. 2013. Rapid bacterial whole-genome sequencing to enhance diagnostic and public health microbiology. *JAMA Internal Medicine* 173 (15): 1397–1404. doi:10.1001/jamainternmed.2013.7734.
- Rice, LB, Carias, LL, Hujer, AM, Bonafede, M, Hutton, R, Huyen, C, ja Bonomo, RA. 2000. High-Level Expression of Chromosomally Encoded SHV-1-Lactamase and an Outer Membrane Protein Change Confer Resistance to Ceftazidime and Piperacillin-Tazobactam in a Clinical Isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (2): 362–67.
- Roberts, MC. 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* 245 (2): 195–203. doi:10.1016/j.femsle.2005.02.034.
- Robicsek, A, Strahilevitz, J, Jacoby, GA, Macielag, M, Abbanat, D, Park, CH, Bush, K, ja Hooper, DC. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine* 12: 83–88. doi:10.1038/nm1347.
- Robin, F, Delmas, J, Archambaud, M, Schweitzer, C, Chanal, C, ja Bonnet, R. 2006. CMT-type-lactamase TEM-125, an emerging problem for extended-spectrum-lactamase detection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (7): 2403–8. doi:10.1128/AAC.01639-05.
- Rozwandowicz, M, Brouwer, MSM, Fischer, J, Wagenaar, JA, Gonzalez-Zorn, B, Guerra, B, Mevius, DJ, ja Hordijk, J. 2018. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73 (5). Oxford University Press: 1121–37. doi:10.1093/jac/dkx488.
- RStudio Team. Inc. Boston. 2016. Integrated development for R. RStudio. <http://www.rstudio.com/>.
- Rupp, ME, ja Fey, PD. 2003. Extended spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs* 63 (4): 353–65. doi:10.2165/00003495-200363040-00002.
- Rychlik, I, Tiwari, V, Schaufler, K, Semmler, T, Pickard, DJ, Toro, M De, La Cruz, F De, Wieler, LH, Ewers, C, ja Guenther, S. 2016. Carriage of extended-spectrum beta-lactamase-plasmids does not reduce fitness but enhances virulence in some strains of pandemic *E. coli* lineages. *Frontiers in Microbiology* 1: 336. doi:10.3389/fmicb.2016.00336.
- Sandegren, L, Linkevicius, M, Lytsy, B, Sa Melhus, A, ja Andersson, DI. 2012. Transfer of an *Escherichia coli* ST131 multiresistance cassette has created a *Klebsiella pneumoniae*-specific plasmid associated with a major nosocomial outbreak. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (1): 74–83. doi:10.1093/jac/dkr405.
- Sanders, CC, Iaconis, JP, Bodey, GP, ja Samonis, G. 1988. Resistance to ticarcillin-potassium clavulanate among clinical isolates of the family Enterobacteriaceae: Role of PSE-1  $\beta$ -lactamase and high levels of TEM-1 and SHV-1 and problems with false susceptibility in disk diffusion tests. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. Vsk. 32. <http://aac.asm.org/>.
- Sangare, SA, Rondinaud, E, Maataoui, N, Maiga, AI, Guindo, I, Maiga, A, Camara, N, Dicko, OA, Dao, S, Diallo, S, Bougoudogo, F, Andreumont, A, Izetiegouma Maiga, I, ja Armand-Lefevre, L. 2017. Very high prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in bacteremic patients hospitalized in teaching hospitals in Bamako, Mali. *PLoS ONE* 12 (2): e0172652.

doi:10.1371/journal.pone.0172652.

- Saumya, D, Wijetunge, S, Katani, R, Kapur, V, ja Kariyawasam, S. 2015. Complete genome sequence of *Escherichia coli* strain RS218 (O18:H7: K1), associated with neonatal meningitis. *Genome Announc* 3 (4): 804–19. doi:10.1128/genomeA.00804-15.
- Schaufler, K, Nowak, K, Dux, A, Semmler, T, Villa, L, Kourouma, L, Bangoura, K, Wieler, LH, Leendertz, FH, ja Guenther, S. 2018. Clinically relevant ESBL-producing *K. pneumoniae* ST307 and *E. coli* ST38 in an urban West African rat population. *Frontiers in Microbiology* 9. Frontiers Media S.A.: 150. doi:10.3389/fmicb.2018.00150.
- Schaufler, K, Semmler, T, Pickard, DJ, Toro, M De, La Cruz, F De, Wieler, LH, Ewers, C, ja Guenther, S. 2016. Carriage of extended-spectrum beta-lactamase-plasmids does not reduce fitness but enhances virulence in some strains of pandemic *E. coli* lineages. *Frontiers in Microbiology* 7. Frontiers Media S.A.: 336. doi:10.3389/fmicb.2016.00336.
- Schneiders, T, Amyes, SGB, ja Levy, SB. 2003. Role of AcrR and RamA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (9): 2831–37. doi:10.1128/AAC.47.9.2831-2837.2003.
- Schürch, AC, ja Schaik, W van. 2017. Challenges and opportunities for whole-genome sequencing–based surveillance of antibiotic resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1388 (1). Blackwell Publishing Inc.: 108–20. doi:10.1111/nyas.13310.
- Sekizuka, T, Yatsu, K, Inamine, Y, Segawa, T, Nishio, M, Kishi, N, ja Kuroda, M. 2018. Complete genome sequence of a bla KPC-2-positive *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from the effluent of an urban sewage treatment plant in Japan. *mSphere* 3 (5): e00314-18. doi:10.1128/mSphere.00314-18.
- Shannon, K, Williams, H, King, A, ja Phillips, I. 1990. Hyperproduction of TEM-1 beta-lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli* serotype O15. *FEMS Microbiology Letters* 67 (3): 319–23. doi:10.1111/j.1574-6968.1990.tb04040.x.
- Sheikh, J, Czczulin, JR, Harrington, S, Hicks, S, Henderson, IR, Bouguénec, C Le, Gounon, P, Phillips, A, ja Nataro, JP. 2002. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation* 110 (9). The American Society for Clinical Investigation: 1329–37. doi:10.1172/JCI16172.
- Shin, J, ja Ko, KS. 2014. Single origin of three plasmids bearing bla CTX-M-15 from different *Klebsiella pneumoniae* clones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (4): 969–972. doi:10.1093/jac/dkt464.
- Siguié, P, Gourbeyre, E, ja Chandler, M. 2014. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiology Reviews* 38 (5): 865–91. doi:10.1111/1574-6976.12067.
- Siguié, P, Perochon, J, Lestrade, L, Mahillon, J, ja Chandler, M. 2006. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Research* 34. Oxford University Press: D32–36. doi:10.1093/nar/gkj014.
- Srijan, A, Margulieux, KR, Ruekit, S, Snedrud, E, Maybank, R, Serichantalergs, O, Kormanee, R, Sukhchat, P, Sriyabhaya, J, Hinkle, M, Crawford, JM, McGann, P, ja Swierczewski, BE. 2018. Genomic characterization of nonclonal mcr-1-positive multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from clinical samples in Thailand. *Microbial Drug Resistance* 24 (4): 403–10. doi:10.1089/mdr.2017.0400.
- Stecher, B, Maier, L, ja Hardt, W-D. 2013. "Blooming" in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nature Reviews Microbiology* 11: 277–284. doi:10.1038/nrmicro2989.
- Struve, C, Bojer, M, ja Krogfelt, KA. 2008. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infection and Immunity* 76 (9): 4055–65. doi:10.1128/IAI.00494-08.
- Struve, C, Roe, CC, Stegger, M, Stahlhut, SG, Hansen, DS, Engelthaler, DM, Andersen, PS, Driebe, EM,

- Keim, P, ja Krogfelt, KA. 2015. Mapping the evolution of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *mBio* 6 (4): e00630-15. doi:10.1128/mBio.00630-15.
- Talebi, A, Abadi, B, Rizvanov, AA, Haertlé, T, ja Blatt, NL. 2019. World Health Organization Report: Current crisis of antibiotic resistance. *BioNanoScience* 9 (4): 778–788. doi:10.1007/s12668-019-00658-4.
- Tamminen, M, Virta, M, Fani, R, ja Fondi, M. 2011. Large-scale analysis of plasmid relationships through gene-sharing networks. *Molecular Biology and Evolution* 29 (4): 1225–1240. doi:10.1093/molbev/msr292.
- Tettelin, H, Riley, D, Cattuto, C, Medini, D, Brinkman, F, ja Parkhill, J. 2008. Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Current Opinion in Microbiology* 12: 472–77. doi:10.1016/j.mib.2008.09.006.
- Thomas, CM. 2000. Paradigms of plasmid organization. *Molecular Microbiology* 37 (3): 485–91.
- Tipper, DJ, ja Stromninger, JL. 1965. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 54 (4): 1133–41. doi:https://doi.org/10.1073/pnas.54.4.1133.
- Trifi, A, Abdellatif, S, Abdennebi, C, Daly, F, Nasri, R, Touil, Y, ja Lakhal, S Ben. 2018. Appropriateness of empiric antimicrobial therapy with imipenem/colistin in severe septic patients: observational cohort study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 17: 39. doi:10.1186/s12941-018-0292-7.
- VFDB. 2018. <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/compvfs.cgi?Genus=Escherichia>.
- Wang, X, Xie, Y, Li, G, Liu, J, Li, X, Tian, L, Sun, J, Ou, H-Y, ja Qu, H. 2018. Whole-genome-sequencing characterization of bloodstream infection-causing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* of capsular serotype K2 and ST374. *Virulence* 9 (1): 510–21. doi:10.1080/21505594.2017.1421894.
- Warnes, G R Bolker, B Bonebakker, L Gentleman, R Huber, W Liaw, A Lumley, T Maechler, M Magnusson, A Moeller, S Schwartz, M Venables, B. 2016. gplots: Various R programming tools for plotting data. *R package version*.
- Wetterstrand, KA. 2019. DNA sequencing costs: Data from the NHGRI genome sequencing program (GSP). Viitattu marraskuuta 8. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>.
- Wickham, H. 2016. ggplot2: Elegant graphics for data analysis. *Springer-Verlag New York*.
- Woerther, P-L, cile Angebault, C, Jacquier, H, Hugede, H-C, Janssens, A-C, Sayadi, S, Mniai, A El, Armand-Lefèvre, L, Ruppé, E, xois Barbier, F, Raskine, L, Page, A-L, Rekeneire, N de, ja Andreumont, A. 2019. Massive Increase, Spread, and Exchange of Extended Spectrum b-Lactamase-Encoding Genes Among Intestinal Enterobacteriaceae in Hospitalized Children With Severe Acute Malnutrition in Niger. Viitattu maaliskuuta 20. doi:10.1093/cid/cir522.
- Wong, JLC, Romano, M, Kerry, LE, Kwong, H-S, Low, W-W, Brett, SJ, Clements, A, Beis, K, ja Frankel, G. 2019. OmpK36-mediated carbapenem resistance attenuates ST258 *Klebsiella pneumoniae* in vivo. *Nature Communications* 10 (3957). doi:10.1038/s41467-019-11756-y.
- World Health Organization. 2017a. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017. <https://www.who.int/glass/en/>.
- . 2017b. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
- . 2018a. International coordination group on vaccine provision for epidemic meningitis: Report of the annual meeting, Geneva, 18 September 2018. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/279828>.
- . 2018b. WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation.



[https://www.who.int/medicines/areas/rational\\_use/oms-amr-amc-report-2016-2018/en/](https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/oms-amr-amc-report-2016-2018/en/).

- Wuf, P-J, Shannon, K, ja Phillips, I. 1995. Mechanisms of hyperproduction of TEM-1  $\beta$ -lactamase by clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vsk. 36. <https://academic.oup.com/jac/article-abstract/36/6/927/804774>.
- Wyres ID, KL, Wick ID, RR, Judd ID, LM, Froumine, R, Tokolyi, AI, GorrieID, CL, C LamID, MM, DuchêneID, S, Jenney, A, ja Holt, KE. 2019a. Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS Genet* 15 (4): e1008114. doi:10.1371/journal.pgen.1008114.
- . 2019b. Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS Genet* 15 (4): e1008114. doi:10.1371/journal.pgen.1008114.
- Wyres, KL, ja Holt, KE. 2018. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 45: 131–39. doi:10.1016/j.mib.2018.04.004.
- Xie, Y, Tian, L, Li, G, Qu, H, Sun, J, Liang, W, Li, X, Wang, X, Deng, Z, Liu, J, ja Ou, H-Y. 2018. Emergence of the third-generation cephalosporin-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* due to the acquisition of a self-transferable bla DHA-1-carrying plasmid by an ST23 strain. *Virulence* 9. doi:10.1080/21505594.2018.1456229.
- Xu, A, Chuang, S, Scullen, OJ, Huang, L, Sheen, S, Sheen, LY, Johnson, JR, ja Sommers, CH. 2019. Thermal inactivation of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* suspended in ground chicken meat. *Food Control*. doi:10.1016/j.foodcont.2019.05.001.
- Yang, F. 2005. Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. *Nucleic Acids Research* 33 (19): 6445–58. doi:10.1093/nar/gki954.
- Yatsunencko, T, Rey, FE, Manary, MJ, Trehan, I, Gloria Dominguez-Bello, M, Contreras, M, Magris, M, Hidalgo, G, Baldassano, RN, Anokhin, AP, Heath, AC, Warner, B, Reeder, J, Kuczynski, J, Caporaso, JG, Lozupone, CA, Lauber, C, Clemente, JC, Knights, D, Knight, R, ja Gordon, JI. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486: 222–227. doi:10.1038/nature11053.
- Yong, D, Toleman, MA, Giske, CG, Cho, HS, Sundman, K, Lee, K, ja Walsh, TR. 2009. Characterization of a new metallo-lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (12): 5046–54. doi:10.1128/AAC.00774-09.
- Yu, W-L, Lee, M-F, Tang, H-J, Chang, M-C, ja Chuang, Y-C. 2015. Low prevalence of rmpA and high tendency of rmpA mutation correspond to low virulence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Virulence* 6 (2): 162–72. doi:10.1080/21505594.2015.1016703.
- Zankari, E, Hasman, H, Cosentino, S, Vestergaard, M, Rasmussen, S, Lund, O, Aarestrup, FM, ja Larsen, M V. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (11). Oxford University Press: 2640–44. doi:10.1093/jac/dks261.
- Zlatkov, N, ja Eric Uhlin, B. 2019. Absence of global stress regulation in *Escherichia coli* promotes pathoadaptation and novel c-di-GMP-dependent metabolic capability. *Nature Reviews Microbiology* 9 (2600): 123–140. doi:10.1038/s41598-019-39580-w.

### **Liite 3. Valmistetut kasvatusalustat**

#### **Lurialiemi (engl. Luria Broth, LB) + ampisilliini**

10 g tryptonia, 10 g NaCl, 5 g hiivauutetta liuotettiin yhteen litraan tislattua vettä. Liuos jaettiin 10 ml:n eriksi koeputkiin ja steriloidtiin autoklaavissa 121 °C:ssa 20 minuuttia. Steriilisuodatettua ampisilliinin varastoliuosta (0,01 mg/ml) lisättiin 10 µl kutakin 10 ml lysogenialiemiannosta kohden.

#### **Luria-agar (engl. LB-agar)**

10 g tryptonia, 10 g NaCl, 5 g hiivauutetta sekä 12 g agaria liuotettiin yhteen litraan tislattua vettä. Liuos steriloidtiin autoklaavissa 121 °C:ssa 20 minuuttia ja valettiin kasvatusmaljoiksi.

#### **Ravinneliemi (engl. Nutrient Broth)**

10 g peptonia sekä 3 g lihauutetta liuotettiin yhteen litraan tislattua vettä. Liuos jaettiin 10 ml:n eriksi koeputkiin ja steriloidtiin autoklaavissa 121 °C:ssa 20 minuuttia.

#### **Ravinne-agar (engl. Nutrient Agar)**

10 g peptonia, 3 g lihauutetta sekä 15 g agaria liuotettiin yhteen litraan tislattua vettä. Liuos steriloidtiin autoklaavissa 121 °C:ssa 20 minuuttia ja valettiin kasvatusmaljoiksi.

#### **Simmon's Citrate Agar + 1 % Inositol, eli SCAI -kasvatusalusta**

Simmon's Citrate Agar – valmissekoitetta (0,2 g/l ammoniumdivetyfosfaatti, 0,08 g/l bromitymolin sininen, 0,8 g/l dinatriummoniumfosfaatti, 0,2 g/l magnesiumsulfaattiheptahydraatti, 15 g agar) (Sigma-Aldrich). Sekoitetta liuotettiin tislattuun veteen valmistajan ohjeen mukaisesti. Autoklaavissa steriloidun (121 °C:ssa 20 minuuttia) kasvatusaineen tilavuudesta poistettiin yksi kymmenesosa, ja tämä tilavuus korvattiin valmistetulla steriilisuodatetulla 10 %:lla myo-inositol-liuoksella (SigmaAldrich).

#### **Müller-Hinton -agar**

Müller-Hinton -valmissekoitetta (2,0 g naudanlihauute, 17,5 g kaseiinihydrosylaatti, 1,5 g tärkkelys 17,0 g agar) (Sigma-Aldrich) liuotettiin tislattuun veteen, steriloidtiin (121 °C:ssa 20 minuuttia) ja valettiin kasvatusalustoiksi.

Kaikkia valettuja kasvatusalustoja säilytettiin 4 °C:ssa enintään kolme viikkoa niiden valmistamisen jälkeen.

## Liite 4: Komentorivillä ajettut komennot

### 1. Lukusekvenssien laatu ja genomien kokoaminen

```
# FastQC-analyysi
fastqc

# Adaptereiden poisto sekä lukusekvenssien siistiminen niiden laadun (-q)
ja pituuden (-m) perusteella: Cutadapt
cutadapt -a CTGTCTCTTATACACATCT -A CTGTCTCTTATACACATCT -m 50 -q 25,25

# Genomin koonti INNUca -työkalulla Docker -säiliössä
INNUca.py --inputDirectory /[] \
          --speciesExpected "Klebsiella pneumoniae" \
          --genomeSizeExpectedMb 5.3 \
          --outdir /data/[] \
          --threads 8 \
          --fastQCproceed \
          --fastQCkeepFiles \
          --trimKeepFiles \
          --saveExcludedContigs

INNUca.py --inputDirectory /[] \
          --speciesExpected "Escherichia coli" \
          --genomeSizeExpectedMb 4.5 \
          --outdir /data/[] \
          --threads 8 \
          --fastQCproceed \
          --fastQCkeepFiles \
          --trimKeepFiles \
          --saveExcludedContigs

# Quast -laatuarvio
quast.py

# Avointen lukukehysten tunnistaminen: Prodigal
prodigal

# Resistenssigeenien, virulenssigeenien sekä liikkuvien geneettisten
elementtien tunnistaminen

## BLASTn (Tietokannat: ResFinder (v. 26.4.2019); VFDB (v. 31.5.2019);
PlasmidFinder (v. 20.11.2018) CARD (v. 25.4.2019), MGE)

blastn -perc_identity 90 -qcov_hsp_perc 80 -max_target_seqs 1

## BLASTp (Tietokanta: CARD (v. 25.4.2019))
blastp -evaluate 1e-100 -max_target_seqs 1
```

### 2. Genomien visualisointi

```

# Alle 1000 nukleotidin mittaisten kontigien poisto
anvi-script-reformat-fasta -l 1000 --simplify-names

# Kontigi-tietokannan muodostaminen
anvi-gen-contigs-database

# Hidden Markov -piilomallin ajo
anvi-run-hmms

# Kontigien annotointi NCBI:n COG (engl. Clusters of Orthologous Groups) -
tietokantaa vasten geenien funktioiden identifioimiseksi
anvi-run-ncbi-cogs

# Geenikartoitus
bowtie2-build [].fa [].index
bowtie2 -x [].index -1 [].1.fastq -2 [].2.fastq -S [].sam
samtools view -bS [].sam ] [].bam
samtools sort [].bam -o [].sorted.bam
samtools index [].sorted.bam

# Profiilitietokannan valmistaminen
anvi-profile --min-contig-length 1000 -i [].sorted.bam --cluster-contigs

# Sekvenssien tuonti
anvi-get-sequences-for-gene-calls

# Taksonomian annotointi Centrifuge (v.1.0.2-beta) -ohjelmalla
centrifuge -f -p 6 -x $CENTRIFUGE_BASE/p+h+v gene-calls.fa -S
centrifuge_hits.tsv

# Taksonomiatiedon vienti kontigi-tietokantaan
anvi-import-taxonomy-for-genes -i centrifuge_report.tsv
centrifuge_hits.tsv -p centrifuge

# Funktionaalinen annotaatio, ja tulosten vienti kontigitietokantaan
Blastn [ResFinder/CARD/MGE/VFDB/PlasmidFinder] -max_target_seqs 1 -
perc_identity 90 -qcov_hsp_perc 80
anvi-import-functions -c kontigitietokanta

# Annotoidun datan valmistelu visualisointia varten
anvi-export-contigs --splits-mode
blastn [ResFinder/CARD/MGE/VFDB/PlasmidFinder] -perc_identity 90 -
max_target_seqs 1 -outfmt "6 qseqid sacc"

# TAB-muotoisen nano-taulukon valmistaminen

# Visualisointi interaktiivisessa näkymässä tunnelin kautta
(localhost:XXXX)
anvi-interactive -c kontigitietokanta -p profiilitietokanta -A [
funktionaaliset annotaatiot ].tab --server-only -P XXXX

```

### 3. Pangenomin muodostus

```
# Genomien tuonti NCBI:n tietokannasta
ncbi-genome-download bacteria -s genbank -A [kaikki 12 genomia] -m

# FASTA-tiedostojen järjestely kansioon, sekvensseille aiemmin
määritettyjen avoimien lukukehysten sivuuttaminen
anvi-script-process-genbank-metadata -m metadata.txt \
                                     --output-dir Klebsiella \
                                     --output-fasta-txt Klebsiella.txt \
                                     --exclude-gene-calls-from-fasta-txt

# Kontigitietokantojen valmistaminen
anvi-script-FASTA-to-contigs-db

# Kontigitietokantojen polut sisältävän nano-tiedoston (TAB-muoto)
valmistaminen

# Sekvenssien tuonti kontigitietokannoista, funktionaalinen annotaatio,
ja tulosten vienti kontigitietokantoihin
anvi-run-ncbi-cogs
anvi-get-sequences-for-gene-calls
blastn [ResFinder/CARD/MobileGeneticElements/VFDB/PlasmidFinder] -
max_target_seqs 1 -perc_identity 90 -qcov_hsp_perc 80* (* muiden paitsi
PlasmidFinderin kohdalla)
anvi-import-functions

# Tulostiedoston muotoilu vastaamaan Anvi'o:n vaatimaa muotoa
printf "gene_callers_id\tsource\taccession\tfunction\tvalue\n" > [].txt

# Funktioiden vienti kontigitietokantaan
anvi-import-functions

# Kaikista genomitietokannoista koostuvan genomivaraston valmistaminen
anvi-gen-genomes-storage --gene-caller prodigal

# Pan-genomianalyysin ajaminen
anvi-pan-genome

# Pan-genomin visualisointi Anvi'o:n interaktiivisessa näkymässä
anvi-display-pan -p profiilitietokanta.db -g kontigivarasto.db --server-
only -P XXXX

# Datan tuonti tilastollisia menetelmiä varten

## Genomien etäisyyssmatriisin luominen (sekvenssi-identiteetti perustuen
Euclidean-samankaltaisuuteen ja Ward-linkitykseen)
anvi-compute-ani
```

```
## Pangenomidatan yhteenvedon tuonti interaktiivisen käsittelyn jälkeen.  
Tätä dataa käytettiin etäisyysmatriisien valmistamiseen.  
anvi-summarize --quick-summary
```

```
## DNA-sekvenssien tuonti kutakin interaktiivisessa käsittelyssä luotua  
"bin" -yksikköä [Core/Unique/Variable] kohden, ja funktionaalinen  
annotaatio näitä sekvenssejä vasten  
anvi-get-sequences-for-gene-clusters -C bins -b [Core/Unique/Variable] --  
report-DNA-sequences
```

```
blastn [ResFinder/CARD/MobileGeneticElements/VFDB/PlasmidFinder] -outfmt  
6 -max_target_seqs 1 -perc_identity 90 -qcov_hsp_perc 80
```

#### 4. Muuta

```
# Pangenomianalyysissä ja K. pneumoniae genomien virulenssigeenien  
vertailussa hyödynnettyjen genomien sekvenssityypitys MLST -työkalulla  
mlst
```

**Liite 5. Pangenomin muodostamisessa ja virulenssigeenien vertailussa käytetyt genomisekvenssit.** Taulukossa on esitetty NCBI-tietokannasta noudettujen *K. pneumoniae* -genomisekvenssien tunnistenumerot sekä isolaattien alkuperää ja sekvensointia koskevat tiedot.

Nimi	Näytetunnus (NCBI)	Alkuperämaa	Julkaisija	Sekvensointimenetelmä(t)	Peittävyys	Kokoamistyökalu(t)	Näytetyyppi
Burkina_1	Tämä tutkimus	Burkina Faso, Afrikka	Tämä tutkimus	Illumina MiSeq	100 x	SPAdes v3.11	ulostenäyte
Burkina_2	Tämä tutkimus	Burkina Faso, Afrikka	Tämä tutkimus	Illumina MiSeq	100 x	SPAdes v3.11	ulostenäyte
GCA_001611055	SAMN04087461	Tzaneio General Hospital, Piraeus, Kreikka, teho-osasto	Sabirova, <i>et al.</i> 2016	Illumina	112 x	SPAdes v. 3.1	keskuslaskimokatetri, potilasnäyte
GCA_001611095	SAMN04087462	Tzaneio General Hospital, Piraeus, Kreikka, teho-osasto	Sabirova, <i>et al.</i> 2016	Illumina	131 x	SPAdes v. 3.1	haavauma, potilasnäyte
GCA_001952875	SAMN04889855	Westchester Medical Center, New York, USA	Huang, <i>et al.</i> 2017	Illumina MiSeq; PacBio	300 x	SPAdes v. 3.5.0; HGAP Assembly v. 3	Potilasnäyte
GCA_001952895	SAMN04889856	Westchester Medical Center, New York, USA	Huang, <i>et al.</i> 2017	Illumina MiSeq; PacBio	300 x	SPAdes v. 3.5.0; HGAP Assembly v. 4	Potilasnäyte
GCA_001952915	SAMN04889857	Westchester Medical Center, New York, USA	Huang, <i>et al.</i> 2017	Illumina MiSeq; PacBio	300 x	SPAdes v. 3.5.0; HGAP Assembly v. 5	Potilasnäyte
GCA_002163895	SAMN06200334	Ruijin Hospital, Shanghai, Kiina, teho-osasto	Wang <i>et al.</i> 2018	Illumina MiSeq; PacBio	400 x	SPAdes v. 3.9	syli, 47-vuotias mies, potilasnäyte
GCA_002591075	SAMN07312483	BC, Kanada	FDA, Heike Sichtig 2017	Illumina; PacBio	600 x	SPAdes v. 3.6.0, SMRT v. 2.3.0, HGAP v. 3	virtsa, potilasnäyte
GCA_002752955	SAMN07792166	Queen Sirikit Naval Hospital, Bangkok, Thaimaa	Srijan <i>et al.</i> 2018	Illumina MiSeq; PacBio	200 x	HGAP v. 2.0	syli, 88-vuotias mies, potilasnäyte
GCA_003584585	SAMD00116246	Tokyo Bay, Tokyo, Japan	Sekizuka, <i>et al.</i> 2018	Illumina MiSeq; Sequel	200 x	SPAdes v. 3.11.1; Canu v. 1.4	jätevedenpuhdistamo, kaupunkien viemärien jätevedet
GCA_003812105	SAMN10163226	Ei tietoa, lastensairaala	FDA, Heike Sichtig 2018	Illumina; PacBio	620 x	SPAdes v.3.6.0, SMRT v. 2.3.0, HGAP v. 3.0	keuhkokuuhtelu, potilasnäyte
GCA_003855315	SAMEA5063299	Oslo, Norja, sairaala	Lam, <i>et al.</i> 2019	Illumina	250 x	SPAdes v. 3.6.2	80-vuotias romanialainen mies, potilasnäyte
GCA_005347525	SAMN11047257	Kerala, Intia, sairaala	Paul, <i>et al.</i> 2019	Illumina MiSeq	140 x	SPAdes v. 3.0.0.	nainen, verinäyte, potilasnäyte



title: "Tilastolliset analyysit"

## pro gradu

Melina Markkanen

25.11.2019

```
require("knitr")
opts_knit$set(root.dir = "~/Opiskelu/Gradu/Pro Gradu/R_data_gradu")
```

```
install.packages("vegan", repos='https://cloud.r-project.org/')
library(vegan)
install.packages("ggpubr", repos='https://cloud.r-project.org/')
library("ggpubr")
library(reshape2)
install.packages("ggplot2", repos='https://cloud.r-project.org/')
library(ggplot2)
install.packages("gplots", repos='https://cloud.r-project.org/')
library(gplots)
```

```
RF_matriisi <- read.delim("~/Opiskelu/Gradu/Pro Gradu/R_data_gradu/RF_matriisi.txt", row.names=1)
MGE_matriisi <- read.delim("~/Opiskelu/Gradu/Pro Gradu/R_data_gradu/MGE_matriisi.txt", row.names=1)
Virulence_matriisi <- read.delim("~/Opiskelu/Gradu/Pro Gradu/R_data_gradu/Vir_matriisi.txt", row.names=1)
ANIB_id <- read.delim("~/Opiskelu/Gradu/Pro Gradu/R_data_gradu/ANIB_pr_id.txt", row.names=1)
```

## Jaccard-etäisyysmatriisit

```
RF_dist <- vegdist(t(as.matrix(RF_matriisi)), method = "jaccard")
MGE_dist <- vegdist(t(as.matrix(MGE_matriisi)), method = "jaccard")
Virulence_dist <- vegdist(t(as.matrix(Virulence_matriisi)), method = "jaccard")
```

## Mantelin testit geeniprofilien parittaiseen vertailuun

```
mantel(ANIB_id, MGE_dist, method = "kendall")

##
## Mantel statistic based on Kendall's rank correlation tau
##
## Call:
## mantel(xdis = ANIB_id, ydis = MGE_dist, method = "kendall")
##
## Mantel statistic r: -0.1922
```

```
##      Significance: 0.967
##
## Upper quantiles of permutations (null model):
##   90%   95% 97.5%   99%
## 0.127 0.158 0.180 0.204
## Permutation: free
## Number of permutations: 999
```

```
mantel(ANIB_id, RF_dist, method = "kendall")
```

```
##
## Mantel statistic based on Kendall's rank correlation tau
##
## Call:
## mantel(xdis = ANIB_id, ydis = RF_dist, method = "kendall")
##
## Mantel statistic r: -0.06381
##      Significance: 0.802
##
## Upper quantiles of permutations (null model):
##   90%   95% 97.5%   99%
## 0.116 0.151 0.169 0.202
## Permutation: free
## Number of permutations: 999
```

```
mantel(ANIB_id, Virulence_dist, method = "kendall")
```

```
##
## Mantel statistic based on Kendall's rank correlation tau
##
## Call:
## mantel(xdis = ANIB_id, ydis = Virulence_dist, method = "kendall")
##
## Mantel statistic r: -0.4262
##      Significance: 1
##
## Upper quantiles of permutations (null model):
##   90%   95% 97.5%   99%
## 0.132 0.166 0.191 0.219
## Permutation: free
## Number of permutations: 999
```

```
mantel(RF_dist, MGE_dist, method = "kendall")
```

```
##
## Mantel statistic based on Kendall's rank correlation tau
##
## Call:
## mantel(xdis = RF_dist, ydis = MGE_dist, method = "kendall")
##
## Mantel statistic r: 0.2171
##      Significance: 0.022
```

```
##
## Upper quantiles of permutations (null model):
##   90%   95% 97.5%   99%
## 0.129 0.170 0.208 0.243
## Permutation: free
## Number of permutations: 999
```

```
mantel(RF_dist, Virulence_dist, method = "kendall")
```

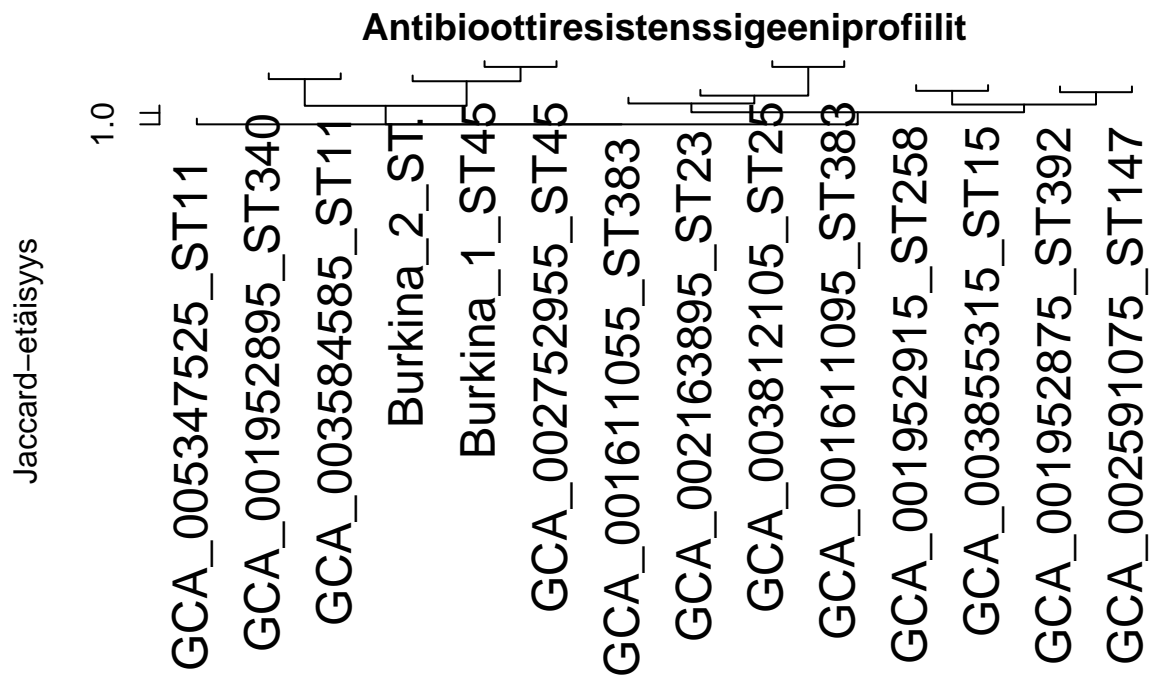
```
##
## Mantel statistic based on Kendall's rank correlation tau
##
## Call:
## mantel(xdis = RF_dist, ydis = Virulence_dist, method = "kendall")
##
## Mantel statistic r: 0.1099
##      Significance: 0.161
##
## Upper quantiles of permutations (null model):
##   90%   95% 97.5%   99%
## 0.169 0.216 0.253 0.305
## Permutation: free
## Number of permutations: 999
```

```
mantel(MGE_dist, Virulence_dist, method = "kendall")
```

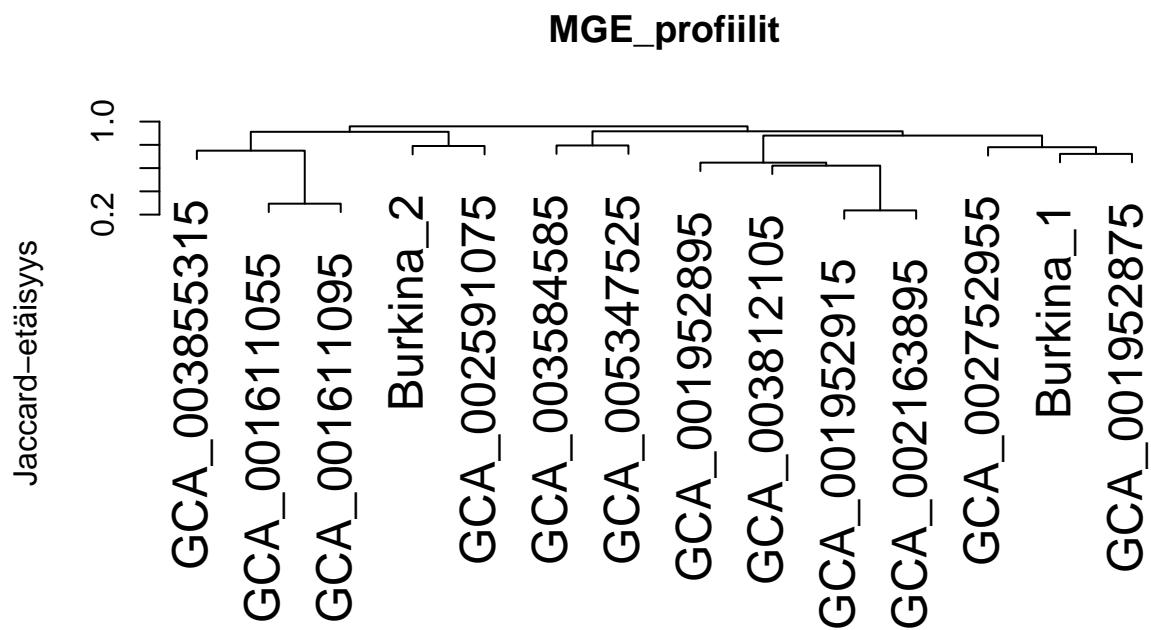
```
##
## Mantel statistic based on Kendall's rank correlation tau
##
## Call:
## mantel(xdis = MGE_dist, ydis = Virulence_dist, method = "kendall")
##
## Mantel statistic r: 0.1083
##      Significance: 0.182
##
## Upper quantiles of permutations (null model):
##   90%   95% 97.5%   99%
## 0.150 0.209 0.242 0.267
## Permutation: free
## Number of permutations: 999
```

## Klusterianalyysit

```
hc <- hclust(as.dist(RF_dist))
plot(hc, cex = 1.5, main = "Antibioottiresistenssigeeniprofiilit", ylab = "Jaccard-etäisyys")
```

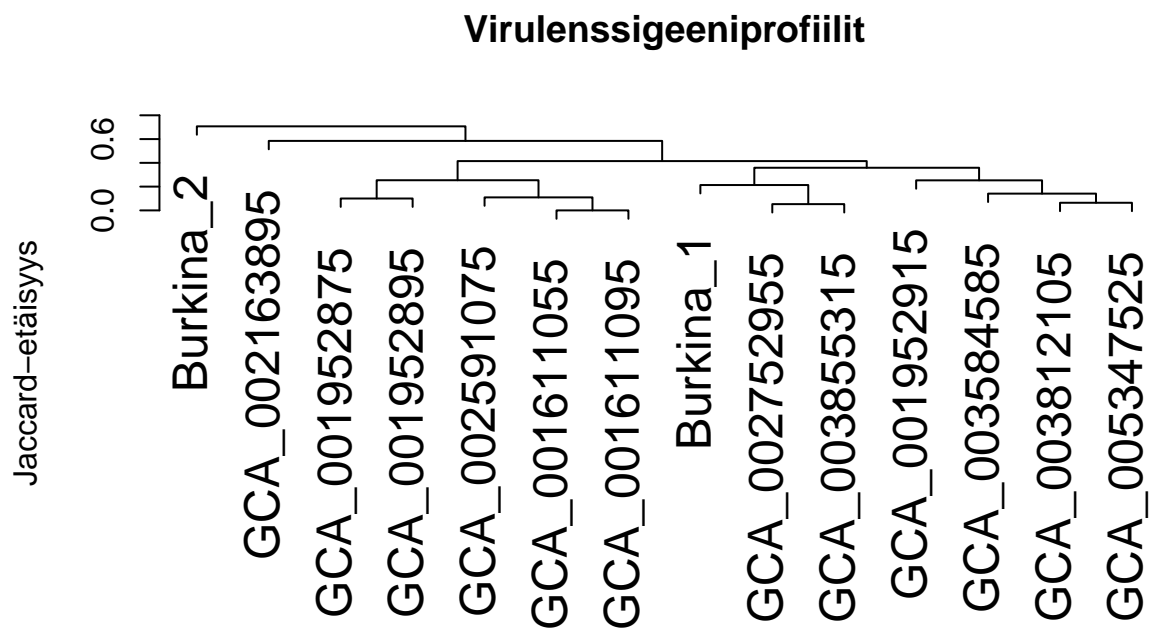


```
hc1 <- hclust(as.dist(MGE_dist))
plot(hc1, cex = 1.5, main = "MGE_profiilit", ylab = "Jaccard-etäisyys")
```



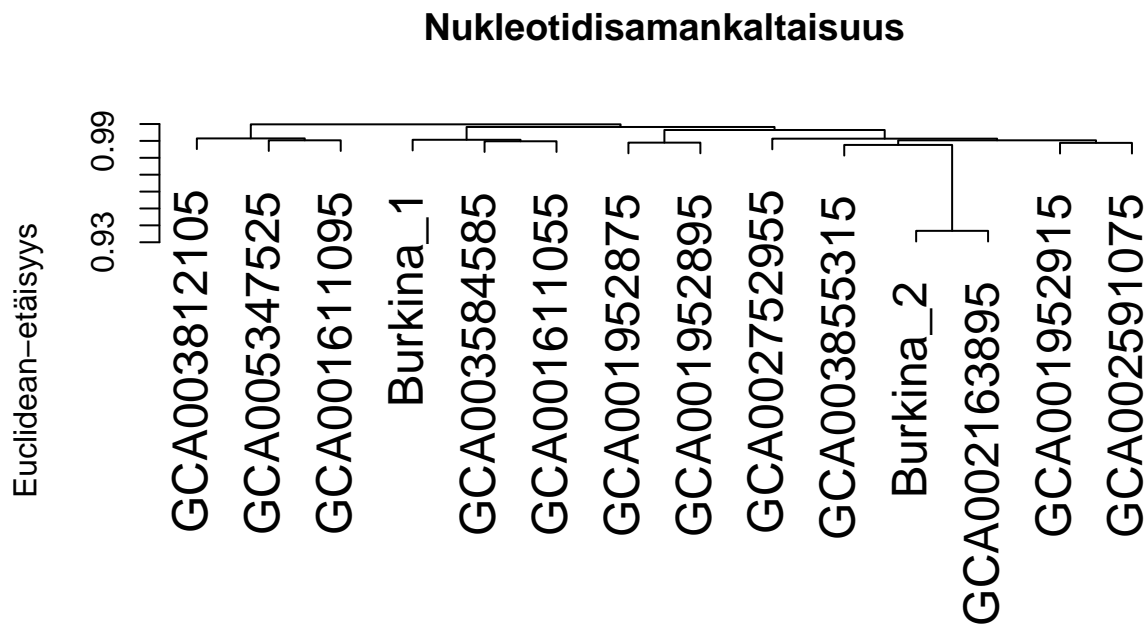
```
as.dist(MGE_dist)
hclust (*, "complete")
```

```
hc2 <- hclust(as.dist(Virulence_dist))
plot(hc2, cex = 1.5, main = "Virulenssigeeniprofiilit", ylab = "Jaccard-etäisyys")
```



```
as.dist(Virulence_dist)
hclust (*, "complete")
```

```
hc3 <- hclust(as.dist(ANIb_id))
plot(hc3, cex = 1.5, main = "Nukleotidisamankaltaisuus", ylab = "Euclidean-etiäisyys")
```



```
as.dist(ANlb_id)
hclust (*, "complete")
```

## Korrelaatioanalyysi

```
Korrelaatio <- read.delim("~/Opiskelu/Gradu/Pro Gradu/R_data_gradu/Korrelaatio.txt", row.names=1)
```

```
shapiro.test(Korrelaatio$Virulenssi)
```

```
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data: Korrelaatio$Virulenssi
## W = 0.9517, p-value = 0.5874
```

```
shapiro.test(Korrelaatio$ResFinder)
```

```
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data: Korrelaatio$ResFinder
## W = 0.95373, p-value = 0.62
```

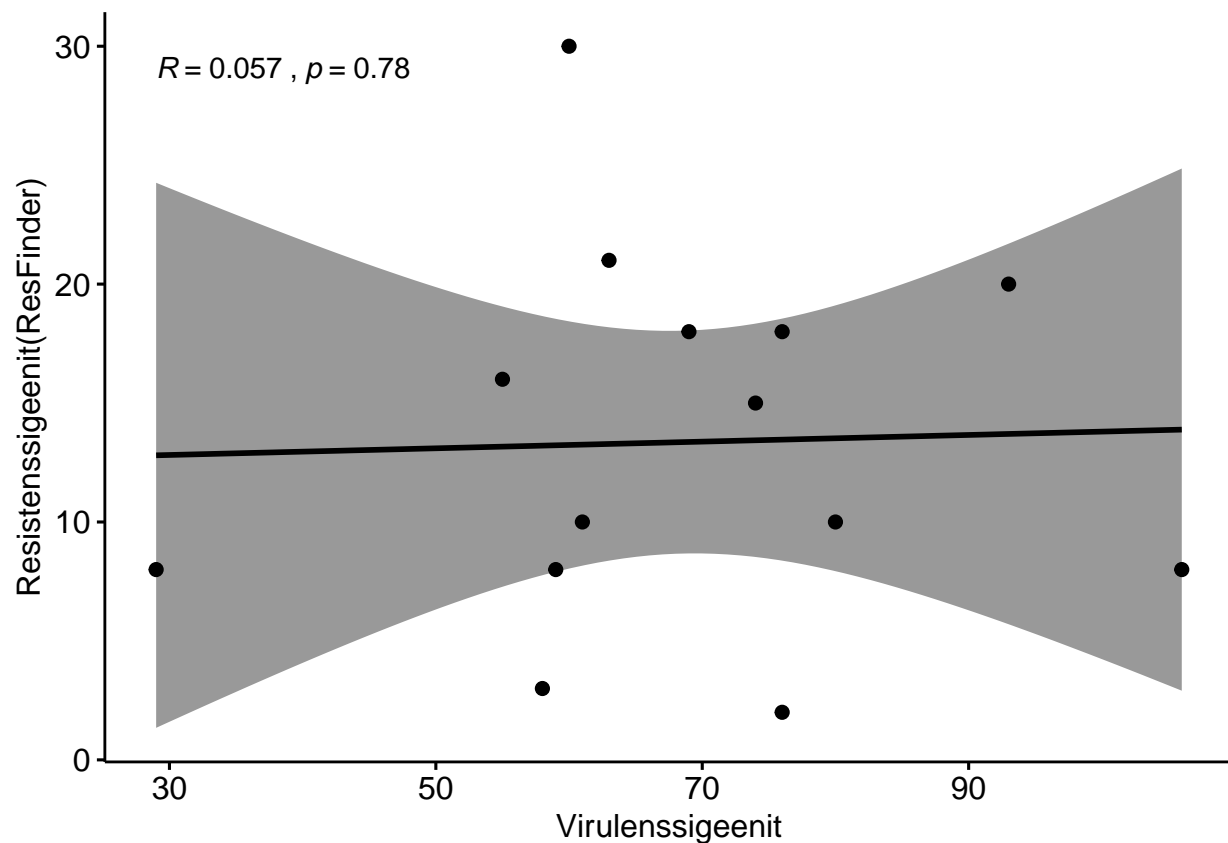
```
shapiro.test(Korrelaatio$MGE)
```

```
##  
## Shapiro-Wilk normality test  
##  
## data: Korrelaatio$MGE  
## W = 0.90627, p-value = 0.1391
```

```
shapiro.test(Korrelaatio$CARD)
```

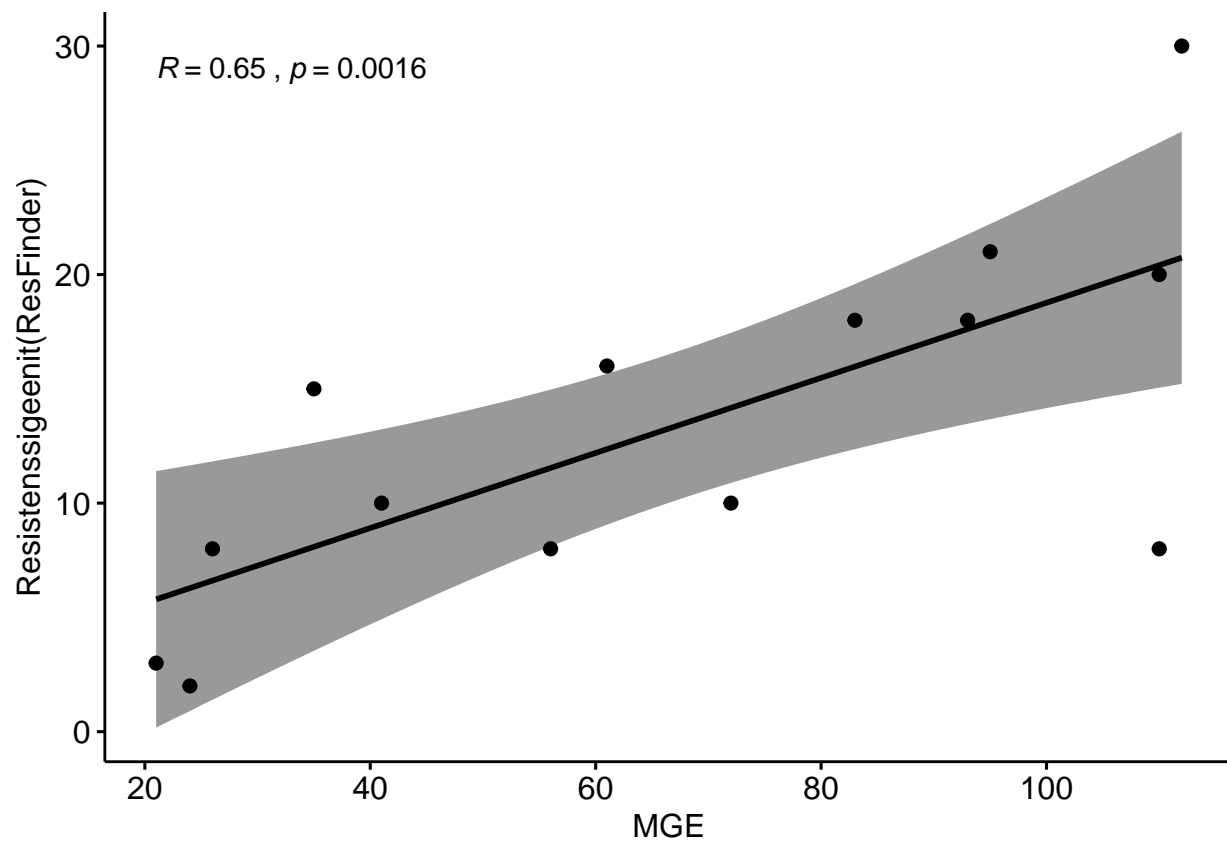
```
##  
## Shapiro-Wilk normality test  
##  
## data: Korrelaatio$CARD  
## W = 0.96166, p-value = 0.7503
```

```
ggscatter(Korrelaatio, x = "Virulenssi", y = "ResFinder",  
  add = "reg.line", conf.int = TRUE,  
  cor.coef = TRUE, cor.method = "kendall",  
  xlab = "Virulenssigeenit", ylab = "Resistenssigeenit(ResFinder)")
```

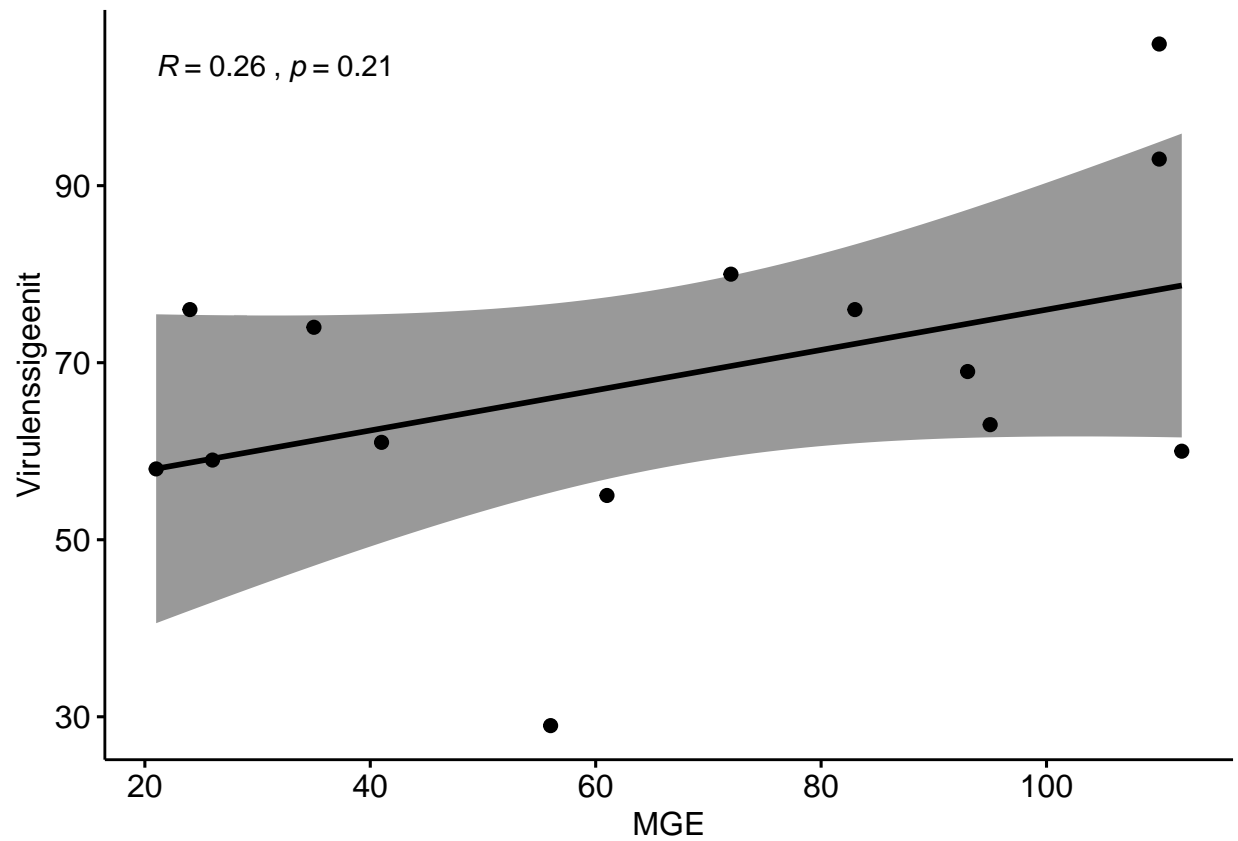


```
ggscatter(Korrelaatio, x = "MGE", y = "ResFinder",  
  add = "reg.line", conf.int = TRUE,  
  cor.coef = TRUE, cor.method = "kendall",  
  xlab = "MGE", ylab = "Resistenssigeenit(ResFinder)")
```

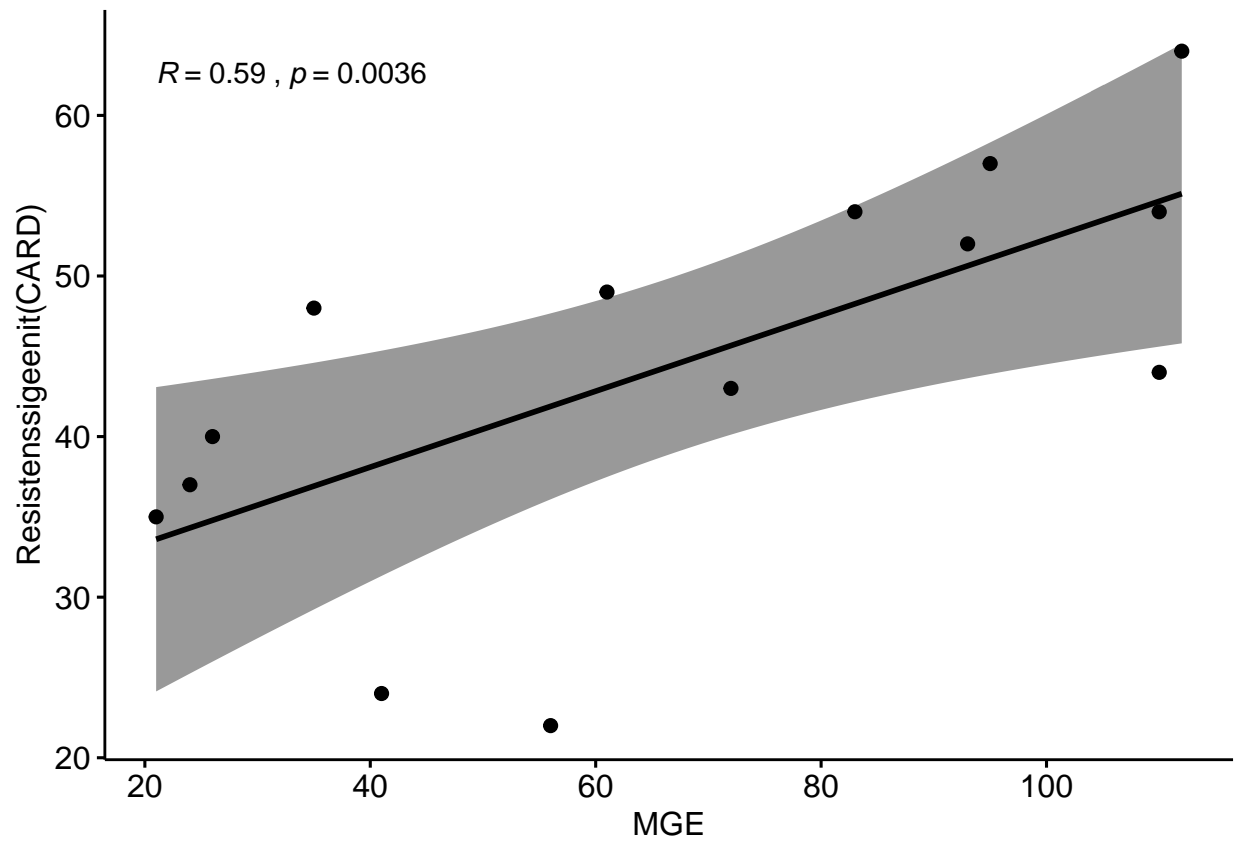




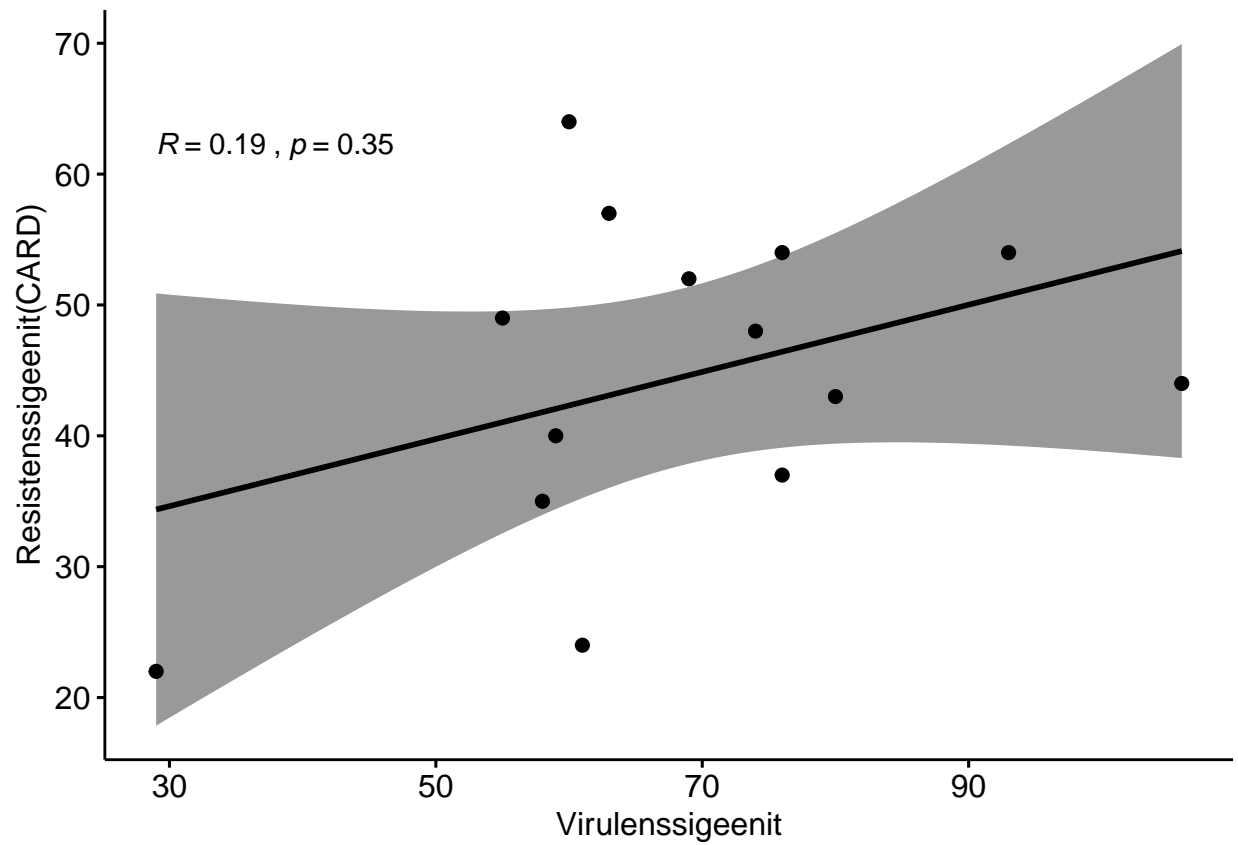
```
ggscatter(Korrelaatio, x = "MGE", y = "Virulenssi",  
  add = "reg.line", conf.int = TRUE,  
  cor.coef = TRUE, cor.method = "kendall",  
  xlab = "MGE", ylab = "Virulenssigeenit")
```



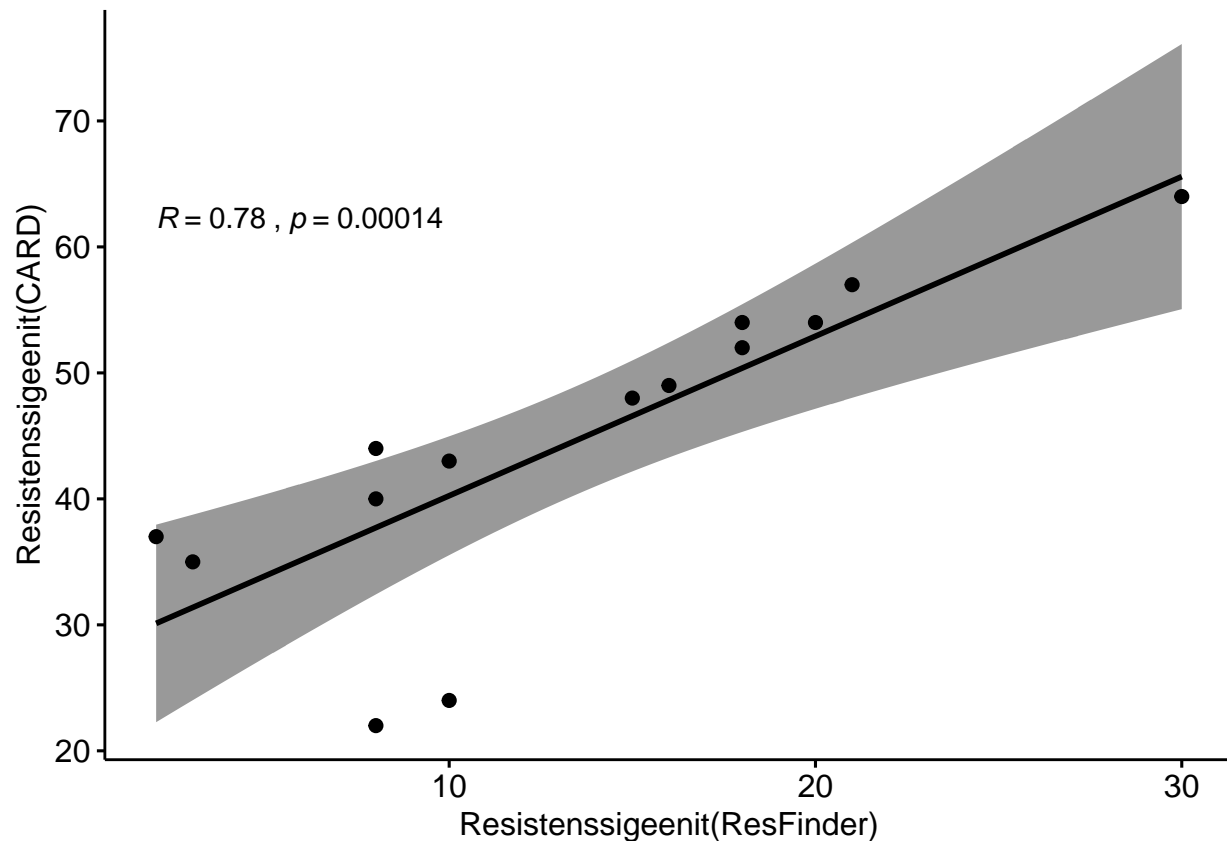
```
ggscatter(Korrelaatio, x = "MGE", y = "CARD",
  add = "reg.line", conf.int = TRUE,
  cor.coef = TRUE, cor.method = "kendall",
  xlab = "MGE", ylab = "Resistenssigeenit(CARD)")
```



```
ggscatter(Korrelaatio, x = "Virulenssi", y = "CARD",
  add = "reg.line", conf.int = TRUE,
  cor.coef = TRUE, cor.method = "kendall",
  xlab = "Virulenssigeenit", ylab = "Resistenssigeenit(CARD)")
```



```
ggscatter(Korrelaatio, x = "ResFinder", y = "CARD",
  add = "reg.line", conf.int = TRUE,
  cor.coef = TRUE, cor.method = "kendall",
  xlab = "Resistenssigeenit(ResFinder)", ylab = "Resistenssigeenit(CARD)")
```



```
cormat <- cor(Korrelaatio, method = c("kendall"))
head(cormat)
```

```
##           Virulenssi  ResFinder      MGE      CARD
## Virulenssi 1.00000000 0.05683286 0.2555556 0.1888889
## ResFinder 0.05683286 1.00000000 0.6478946 0.7842935
## MGE       0.25555556 0.64789462 1.0000000 0.5888889
## CARD      0.18888889 0.78429349 0.5888889 1.0000000
```

```
cormat <- round(cormat, digits = 2)
melted_cormat <- melt(cormat)
head(melted_cormat)
```

```
##      Var1      Var2 value
## 1 Virulenssi Virulenssi 1.00
## 2 ResFinder Virulenssi 0.06
## 3      MGE Virulenssi 0.26
## 4      CARD Virulenssi 0.19
## 5 Virulenssi ResFinder 0.06
## 6 ResFinder ResFinder 1.00
```

```
get_lower_tri<-function(cormat){
  cormat[upper.tri(cormat)] <- NA
  return(cormat)
```

```

}
get_upper_tri <- function(cormat){
  cormat[lower.tri(cormat)]<- NA
  return(cormat)
}
upper_tri <- get_upper_tri(cormat)
upper_tri

```

```

##           Virulenssi ResFinder  MGE CARD
## Virulenssi          1      0.06 0.26 0.19
## ResFinder          NA      1.00 0.65 0.78
## MGE                NA      NA 1.00 0.59
## CARD              NA      NA  NA 1.00

```

```

melted_cormat <- melt(upper_tri, na.rm = TRUE)
ggheatmap <- ggplot(melted_cormat, aes(Var2, Var1, fill = value))+
  geom_tile(color = "white")+
  scale_fill_gradient2(low = "skyblue1", high = "mediumorchid", mid = "white",
    midpoint = 0, limit = c(-1,1), space = "Lab",
    name="Kendall\nCorrelation") +
  theme_minimal()+ # minimal theme
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 45, vjust = 1,
    size = 12, hjust = 1))+
  coord_fixed()

```

```

reorder_cormat <- function(cormat){
  # Use correlation between variables as distance
  dd <- as.dist((1-cormat)/2)
  c <- hclust(dd)
  cormat <-cormat[c$order, c$order]
}
cormat <- reorder_cormat(cormat)
upper_tri <- get_upper_tri(cormat)
melted_cormat <- melt(upper_tri, na.rm = TRUE)
ggheatmap <- ggplot(melted_cormat, aes(Var2, Var1, fill = value))+
  geom_tile(color = "white")+
  scale_fill_gradient2(low = "skyblue1", high = "mediumorchid", mid = "white",
    midpoint = 0, limit = c(-1,1), space = "Lab",
    name="Kendall\nCorrelation") +
  theme_minimal()+ # minimal theme
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 45, vjust = 1,
    size = 12, hjust = 1))+
  coord_fixed()

```

```

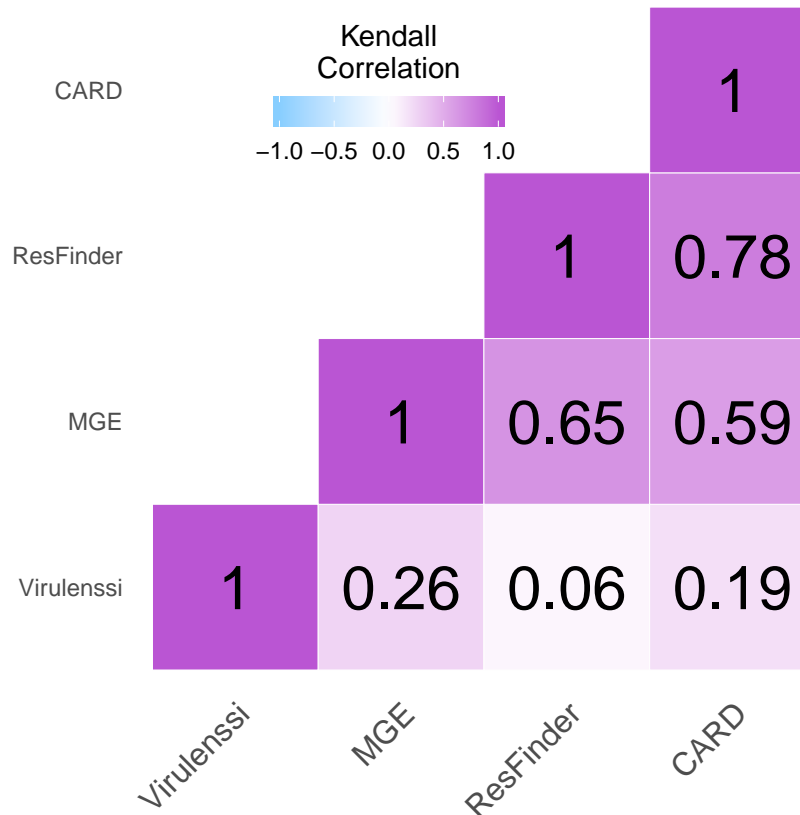
cormat <- reorder_cormat(cormat)
upper_tri <- get_upper_tri(cormat)
melted_cormat <- melt(upper_tri, na.rm = TRUE)
ggheatmap +
  geom_text(aes(Var2, Var1, label = value), color = "black", size = 8) +
  theme(
    axis.title.x = element_blank(),
    axis.title.y = element_blank(),
    panel.grid.major = element_blank(),

```

```

panel.border = element_blank(),
panel.background = element_blank(),
axis.ticks = element_blank(),
legend.justification = c(1, 0),
legend.position = c(0.55, 0.73),
legend.direction = "horizontal")+
guides(fill = guide_colorbar(barwidth = 6, barheight = 0.8,
                             title.position = "top", title.hjust = 0.5))

```



```

df <- data.frame(sample=rep(c("Burkina_1", "Burkina_2", "muu",
                              "muu", "muu", "muu", "muu",
                              "muu", "muu", "muu", "muu", "muu", "muu"),4),
                 Annotaatio = rep(c("virulence", "ResFinder", "MGE", "CARD"), each=14),
                 hits=c(61, 29, 55, 60, 93, 63, 74, 69, 80, 76, 76,
                        58, 59, 106, 10, 8, 16, 30, 20, 21, 15, 18,
                        10, 18, 2, 3, 8, 8, 41, 43, 61, 112, 110, 95,
                        35, 93, 72, 83, 24, 21, 26, 30, 23, 20, 33, 48,
                        38, 41, 32, 36, 27, 38, 21, 21, 25, 28))

str(df)

```

```

## 'data.frame':   56 obs. of  3 variables:
## $ sample      : Factor w/ 3 levels "Burkina_1","Burkina_2",...: 1 2 3 3 3 3 3 3 3 ...
## $ Annotaatio: Factor w/ 4 levels "CARD","MGE","ResFinder",...: 4 4 4 4 4 4 4 4 4 ...
## $ hits       : num  61 29 55 60 93 63 74 69 80 76 ...

```

```
data_summary <- function(data, varname, groupnames){
  require(plyr)
  summary_func <- function(x, col){
    c(mean = mean(x[[col]], na.rm=TRUE),
      sd = sd(x[[col]], na.rm=TRUE))
  }
  data_sum<-ddply(data, groupnames, .fun=summary_func,
    varname)
  data_sum <- rename(data_sum, c("mean" = varname))
  return(data_sum)
}
```

```
df3 <- data_summary(df, varname="hits",
  groupnames=c("sample", "Annotaatio"))
```

```
## Warning: package 'plyr' was built under R version 3.5.3
```

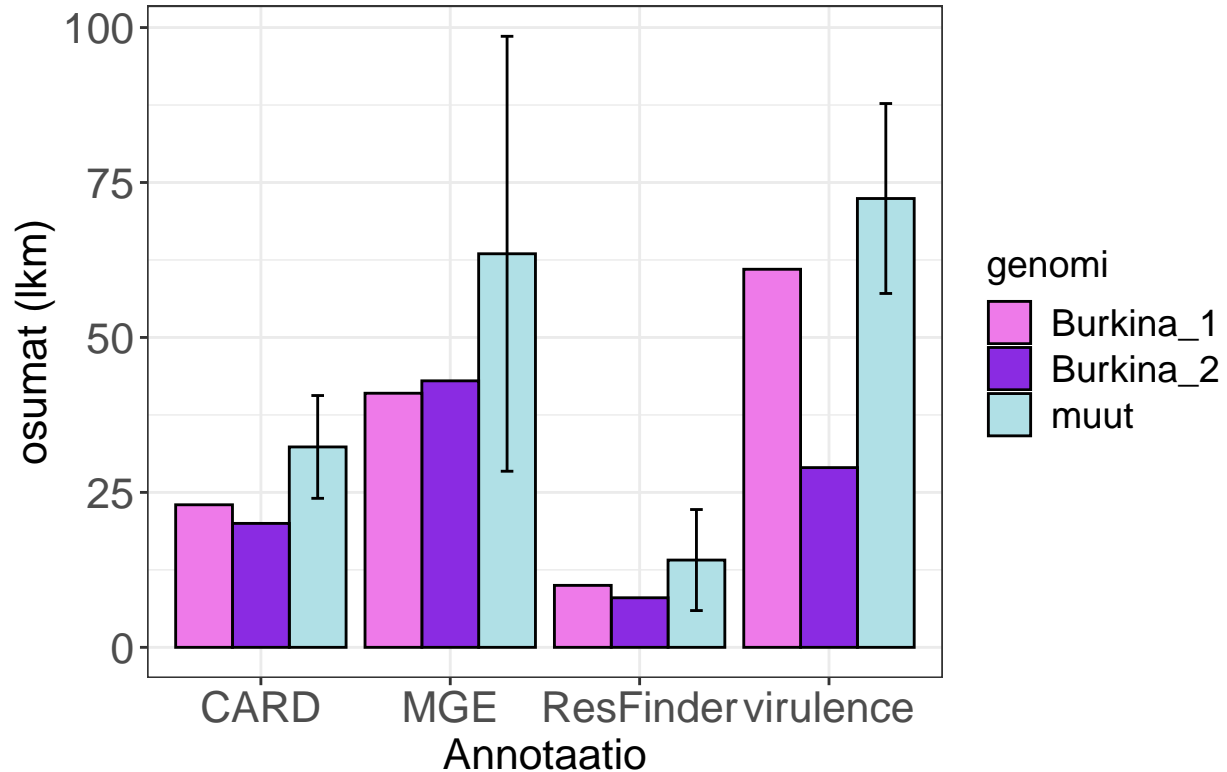
```
df3$annotation=as.factor(df3$Annotaatio)
```

```
p <- ggplot(df3, aes(x=Annotaatio, y=hits, fill=sample)) +
  geom_bar(color="black", stat="identity", position=position_dodge()) +
  geom_errorbar(aes(ymin=hits-sd, ymax=hits+sd), width=.2,
    position=position_dodge(.9))
p + labs(title="Osumien lukumäärät genomia kohden",
  x="Annotaatio", y = "osumat (lkm)") +
  theme_bw() +
  theme(axis.text=element_text(size=16),
    axis.title=element_text(size=16)) +
  theme(legend.text=element_text(size=14)) +
  theme(legend.title=element_text(size=14)) +
  theme(title=element_text(size=16)) +
  scale_fill_manual(values=c('orchid2', 'blueviolet', 'powderblue'),
    name = "genomi", labels = c("Burkina_1", "Burkina_2", "muut"))
```

```
## Warning: Removed 8 rows containing missing values (geom_errorbar).
```



## Osumien lukumäärät genomia kohden



## K. pneumoniae virulenssilämpökartta

```
Virulence_heatmap_2 <- read.delim("~/Opiskelu/Gradu/Pro Gradu/R_data_gradu/Virulence_heatmap_2.txt",
                                row.names=1)
dt = read.table("~/Opiskelu/Gradu/Pro Gradu/R_data_gradu/Virulence_heatmap_2.txt",
                header=TRUE)
dt.matrix <- as.matrix(dt)

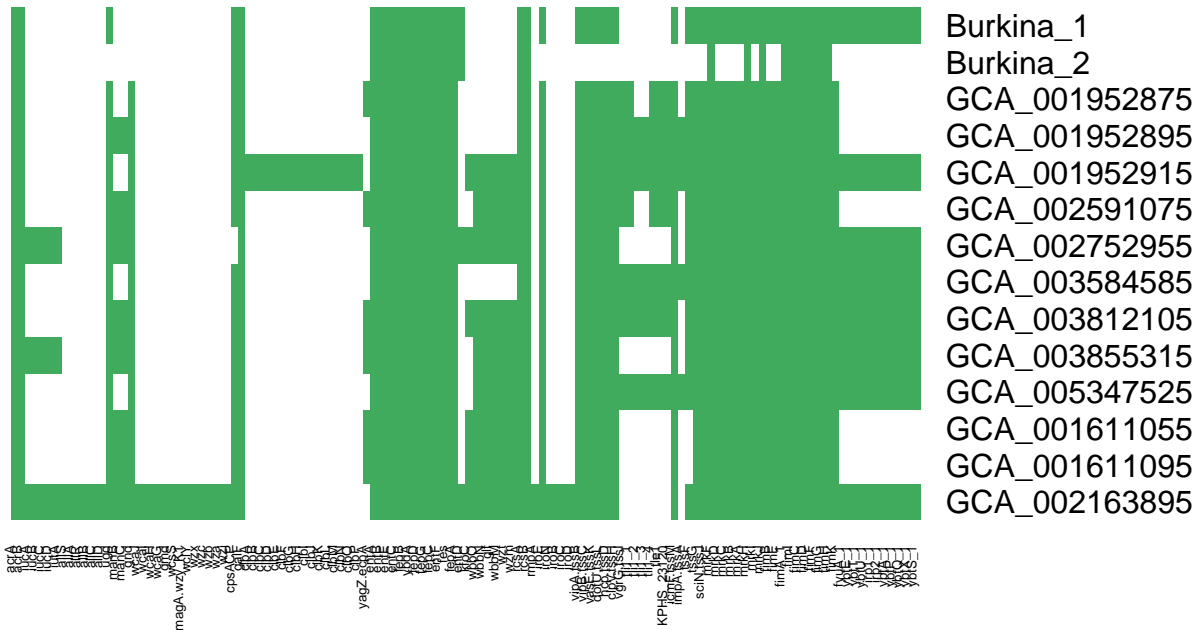
yb <- colorRampPalette(c("white", "#41AB5D"))

lmat <- rbind( c(5,3,4), c(0.75,1,2) )
lhei <- c(1.5, 5)
lwid <- c(0.2, 4, 1)

distance <- vegdist(t(as.matrix(dt.matrix)), method = "jaccard")

heatmap.2(dt.matrix, col = yb, main = "Virulenssigeenit", trace = "none", margins = c(6,2),
          cexRow = 1.5, cexCol = 0.65, Rowv = F, Colv = F,
          key = F, dendrogram="none", lmat=lmat, lhei=lhei, lwid=lwid)
```

## Virulenssigeenit



## E. coli virulenssilämpökartta

```
M1_virulensssiryhmat <- read.delim("~/Opiskelu/Gradu/Pro Gradu/R_data_gradu/M1_virulensssiryhmat.txt",
                                     row.names=1)
dt3.matrix <- as.matrix(M1_virulensssiryhmat)

yb <- colorRampPalette(c("white", "navyblue"))

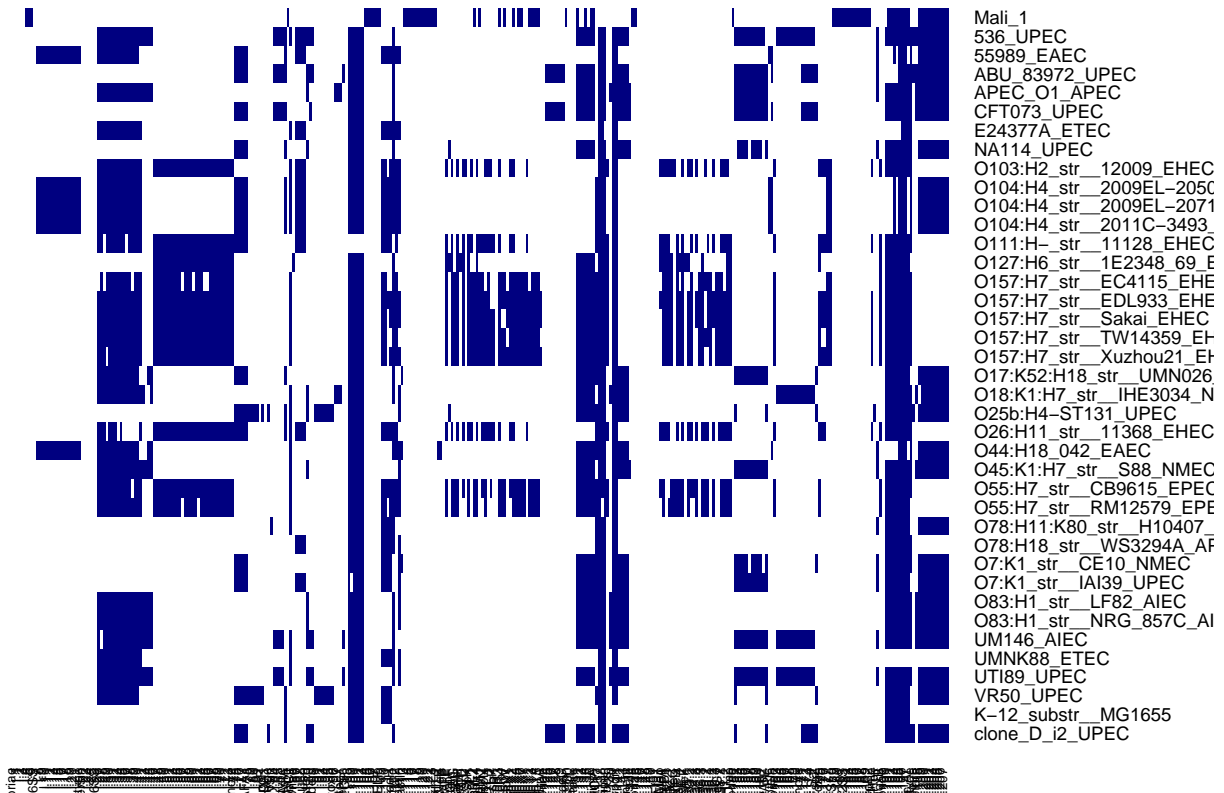
lmat <- rbind(c(5,3,4), c(0.75,1,2))
lhei <- c(0.5, 5)
lwid <- c(0.2, 4, 1)

distance <- vegdist(t(as.matrix(dt3.matrix)), method = "jaccard")

## Warning in vegdist(t(as.matrix(dt3.matrix)), method = "jaccard"): you have
## empty rows: their dissimilarities may be meaningless in method "jaccard"

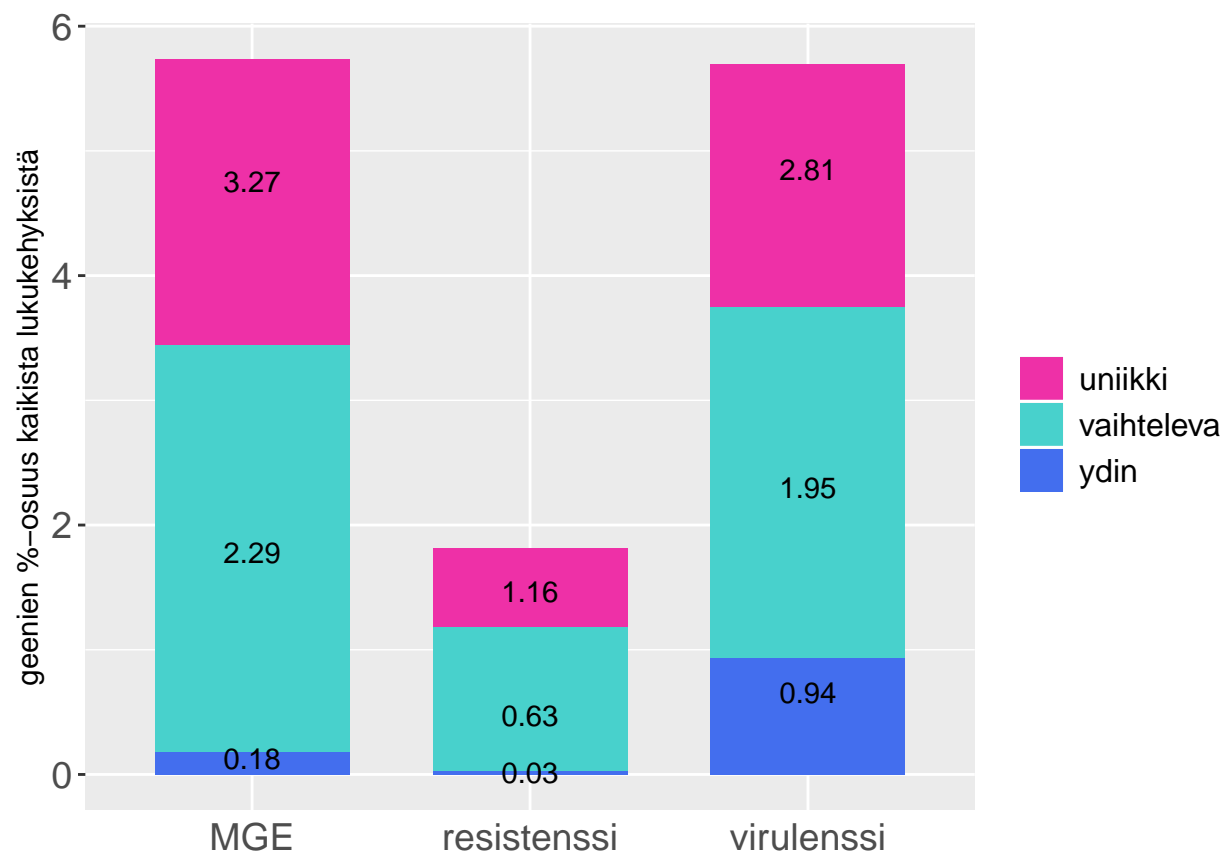
## Warning in vegdist(t(as.matrix(dt3.matrix)), method = "jaccard"): missing
## values in results
```

```
heatmap.2(dt3.matrix, col = yb, trace = "none", margins = c(2,1),
  cexRow = 0.9, cexCol = 0.65, Rowv = F, Colv = F, key = F, dendrogram="none",
  lmat=lmat, lhei=lhei, lwid=lwid)
```



Resistenssi- ja virulenssigeenit sekä MGET kaikkia proteiineja koodaavia geenejä kohtaan (pangenomi)

```
g <- read.delim("~/Opiskelu/Gradu/Pro Gradu/R_data_gradu/g.txt")
s <- ggplot(data = g, aes(x = funktio, y = geenit)) +
  geom_col(aes(fill = genomi), width = 0.7) +
  scale_fill_manual(values = c("maroon2", "mediumturquoise", "royalblue2")) +
  theme(axis.title.x=element_blank(),
    legend.title = element_blank(),
    legend.text = element_text(size = 12),
    axis.text.x = element_text(size = 14),
    axis.text.y = element_text(size = 14),
    axis.ticks.x=element_blank())+
  geom_text(aes(label = numbers, y = geenit), size = 4, position = position_stack(vjust = 0.7))+
  labs(y = "geenien %-osuus kaikista lukukehyksistä", size = 12)
s
```



**Liite 7: Fenotyyppityksen tulokset.** Kustakin näytteestä eristettyjen isolaattien resistenssifenotyypit on esitetty kutakin näytettä vastaavassa taulukossa (7a: Kontrollikannat, 7b: Burkina Faso, Nanoro, ulostenäytteet, 7c: Burkina Faso, Ouagadougou, jätevedet, 7d: Mali, Bamako, ulostenäytteet). Taulukko kuvaa isolaattien fenotyyppissä havaittujen estorenkaiden läpimittaa millimetreissä. EUCAST:n resistenssiä määrittävien raja-arvojen (EUCAST, 2019a) (taulukossa punainen teksti) mukainen vastustuskyky kunkin antibiootin kohdalla on merkitty sinisellä pohjavärillä. Tetrasykliinin kohdalla raja-arvona käytettiin CLSI:n mukaista resistenssin raja-arvoa (CLSI, 2019, www.clsi.org). Antibioottilyhenteet on esitetty taulukossa 2. EUCAST:n mukaisen ESBL-tuotannon varmistustestin tulokset on kuvattu kunkin taulukon oikeassa reunassa otsikon ”Kaksoiskiekkotesti ESBL:n varmistukseksi” alla. Merkintä ”haamukuvio” tarkoittaa positiivista tulosta ja merkintä ”ei” negatiivista tulosta. Merkintä ”-” tarkoittaa, että tätä ESBL-varmistustestiä ei suoritettu, sillä ESBL-seulontatesti antoi negatiivisen tuloksen (Kohta ”ESBL-seulontatesti” taulukon vasemmassa laidassa). Lisäksi kokogenomisekvensointiin valitut isolaatit (Burkina\_1, Burkina\_2, Burkina\_3 ja Mali\_1) on merkitty taulukkoihin.

7a. Kontrollikannat

ESBL:n seulontatesti										Kaksoiskiekkotesti ESBL:n varmistukseksi				
antibioottiluokka	3. polven kefalosporiinit			Karbapeneemit		Penisilliinit	Fluorokinolonit	Tetrasykliinit	Aminoglykosidit	Sekalaiset (sulfa-trimetopriimi)	3. polven kefalosporiinit		4. polven kefalosporiinit	monobaktaamit
antibiootin lyhenne	CAZ-10	CTX-5	CRO-30	IMP-10	MEM-10	AMP-10	CIP-5	TE-30	CN-10	SXT-25	CAZ-30	CTX-30	FEP-3	ATM-30
CAST raja-arvot resistenssille	< 19	< 17	< 22	< 17	< 16	< 14	< 22	≤ 11 (CLSI)	< 14	< 11				
Escherichia coli ATCC 25922 "V"	30	30	30	32	33	17	35	23	20	25	ei	ei	ei	ei
Escherichia coli ATCC 25922 "L"	29	30	32	32	33	20	35	23	24,5	22,5	ei	ei	ei	ei
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	7	13	17	35	36	0	22,5	10,5	19	0	haamukuvio	haamukuvio	ei	haamukuvio

### 7b. Burkina Faso, Nanoro, ulostenäytteet

[illegible]

7c. Burkina Faso, Ouagadougou, jätevedet

			ESBL:n seulontatesti										Kaksoiskiekkotesti ESBL:n varmistukseksi				
antibioottiluokka			3. polven kefalosporiinit			Karbapeneemit		Penisilliinit	Fluorokinolonit	Tetrasykliinit	Aminoglykosidit	Sekalaiset (sulfa-trimetopriimi)	3. polven kefalosporiinit		4. polven kefalosporiinit	monobaktaamit	
antibiootin lyhenne			CAZ-10	CTX-5	CRO-30	IMP-10	MEM-10	AMP-10	CIP-5	TE-30	CN-10	SXT-25	CAZ-30	CTX-30	FEP-3	ATM-30	
isolaatti EUCAST raja-arvot resistenssille			< 19	< 17	< 22	< 17	< 16	< 14	< 22	≤ 11 (CLSI)	< 14	< 11					
Yalgadon sairaalan jäteveden poistoputki	(Burkina 3)	BF12A-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	0	9,5	27	29,5	0	0	23	7,2	0	haamukuvio	haamukuvio	haamukuvio	haamukuvio
		BF12A-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10,5	0	10	≥ 30	≥ 30	0	0	0	8,8	0	haamukuvio	haamukuvio	haamukuvio	haamukuvio
		BF12B-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15,5	0	10,7	≥ 30	≥ 30	0	0	0	8,5	0	haamukuvio	haamukuvio	haamukuvio	haamukuvio
		BF12C-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16,5	0	10	29	≥ 30	0	0	0	8	0	haamukuvio	haamukuvio	haamukuvio	haamukuvio
		BF12C-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	0	9	27,5	≥ 30	0	0	0	7,5	0	haamukuvio	haamukuvio	haamukuvio	haamukuvio
		BF13A-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30	0	28	22	20	27,5	haamukuvio	haamukuvio	haamukuvio	haamukuvio
Jätevesien risteymäkohta, tulovesi		BF13A-2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	10	0	0	0	16	0	20	9	0	19	haamukuvio	haamukuvio	haamukuvio	haamukuvio
		BF13A-2	<i>Serratia marcescens</i>	≥ 30	29,5	≥ 30	29	≥ 30	9	≥ 30	13	24	21	ei	ei	ei	ei
		BF13B-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29	29	≥ 30	≥ 30	≥ 30	0	≥ 30	0	18,5	0	-	-	-	-
		BF13B-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29	29	≥ 30	26	27	0	28	21,5	18	0	ei	ei	ei	ei
		BF13B-3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	28	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30	9,5	≥ 30	24	19	23	-	-	-	-
		BF13C-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30	7	≥ 30	8	18	0	-	-	-	-
		BF13C-2	<i>Citrobacter freundii</i>	19	25	29	21	≥ 30	0	28	21,5	20	24,5	ei	ei	ei	ei
		BF13C-3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥ 30	34	≥ 30	≥ 30	≥ 30	7	27,5	18	20	24	-	-	-	-
Teurastamojäte vesi, esikäsittelyn jälkeen		BF15A-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	27	≥ 30	≥ 30	29	≥ 30	7,5	28	20	18,5	20	-	-	-	-
		BF15A-2	<i>Enterobacter cloacae</i>	27	21,5	≥ 30	26	≥ 30	0	≥ 30	20	20	20	-	-	-	-
		BF15B-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	28	27	≥ 30	≥ 30	≥ 30	7,5	≥ 30	23	20	23	-	-	-	-
		BF15B-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22	27	≥ 30	≥ 30	29,5	0	≥ 30	20,5	19	21,5	ei	ei	ei	ei
		BF15C-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30	0	≥ 30	23	19,5	23	-	-	-	-
		BF15C-2	<i>Citrobacter freundii</i>	≥ 30	29	≥ 30	27	≥ 30	0	≥ 30	23	20	0	-	-	-	-
		BF15C-3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26	28	≥ 30	≥ 30	≥ 30	0	27	20,5	17	21	-	-	-	-

7d. Mali, Bamako, ulostenäytteet

ESBL:n seulontatesti													Kaksoiskiekkotesti ESBL:n varmistukseksi				
antibioottiluokka			3. polven kefalosporiinit			Karbapeneemit		Penisilliinit	Fluorokinolonit	Tetrasykliinit	Aminoglykosidit	Sekalaiset (sulfa-trimetopriimi)	3. polven kefalosporiinit		4. polven kefalosporiinit	monobaktaamit	
antibiootin lyhenne			CAZ-10	CTX-5	CRO-30	IMP-10	MEM-10	AMP-10	CIP-5	TE-30	CN-10	SXT-25	CAZ-30	CTX-30	FEP-3	ATM-30	
isolaatti	EUCAST	raja-arvot resistenssille	< 19	< 17	< 22	< 17	< 16	< 14	< 22	≤ 11 (CLSI)	< 14	< 11					
4-5 kk, sekaruokinta	M12A-1	<i>Klebsiella variicola</i>	27	28	≥ 30	≥ 30	29	11	≥ 30	14	20	21	-	-	-	-	
	M12A-2	<i>Enterobacter cloacae</i>	28	29	≥ 30	≥ 30	≥ 30	18	≥ 30	21	20	18,5	-	-	-	-	
	M12A-3	<i>Klebsiella variicola</i>	29	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30	11	≥ 30	22	18	21	-	-	-	-	
	M12A-4	<i>Enterobacter cloacae</i>	29	29	≥ 30	≥ 30	≥ 30	17	≥ 30	21	20	25	-	-	-	-	
4-5 kk, sekaruokinta	M12B-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	27	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30	0	27	20	20	22	-	-	-	-	
	M12B-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26	28	≥ 30	≥ 30	≥ 30	0	26	22	17	22	-	-	-	-	
	M12B-3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26	27	≥ 30	≥ 30	≥ 30	0	26	20	18	22	-	-	-	-	
4-5 kk, rintamaito (Mali_1)	M12C-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30	0	27	22	17	24	-	-	-	-	
	M12C-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29	29	≥ 30	≥ 30	≥ 30	0	28	20	18	21	-	-	-	-	
	M12C-3	<i>Escherichia coli</i>	15	0	0	29	≥ 30	0	20	0	10	0	haamukuvio	haamukuvio	haamukuvio	haamukuvio	
4-5 kk, rintamaito	M12D-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30	0	≥ 30	0	10	0	-	-	-	-	
	M12D-2	<i>Salmonella sp.</i>	29	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30	0	≥ 30	0	19	0	-	-	-	-	
	M12D-4	<i>Escherichia coli</i>	25	26	29	29	≥ 30	0	-	-	-	-	-	-	-	-	



**Liite 8. Fenotyyppisen ja genotyyppisen resistenssin vertailu.** Taulukossa on esitetty isolaattien genotyyppinen resistenssiprofiili perustuen ResFinder-tietokannan tuloksiin sekä kiekkoherkkyyshmäärityksessä havaittu fenotyyppinen resistenssiprofiili. Fenotyyppinen resistenssi on merkitty sinisellä värillä. Aminoglykosidiresistenssigeeneistä vain *aac(3)-IIa* johti fenotyyppissä ilmentyvään gentamysiiniresistenssiin. Geenit *aac(6')-Ib-cr* sekä *qnrS1* puolestaan olivat vastuussa siprofloksasiiniresistenssistä. Fenotyyppinen resistenssi sulfa-trimetopriimi-yhdistelmäantibiootille havaittiin isolaateissa, jotka kantoivat sekä *sul2\_2*-geeniä että *dfrA*-tyypin geeniä tai vain toista näistä.

Taulukkoon on merkitty lisäksi CARD-tietokantaa hyödyntämällä havaitut OmpK-poriineja ja ulosvirtauspumppuja koodaavien sekvenssien esiintyvyys ja niissä mahdollisesti havaitut mutaatiot. OmpK-poriinien kohdalla tulokset ”täydellinen” tai ”tarkka” viittaavat CARD-tietokannan määrittämiin proteiinihomologi- (OmpK37) tai ”knock out” (OmpK35, OmpK36) -mallien tuloksiin. Isolaattien OmpK37-poriinia koodaavat sekvenssit vastasivat referenssitietokannan sekvenssejä proteiinihomologimallin määrittämisen mukaisesti tasolla ”tarkka” mutta ei ”täydellinen”. Muun muassa tämän vuoksi tämän poriinin mahdollista roolia isolaattien antibioottiresistenssin kannalta oli mahdotonta arvioida. OmpK35- sekä OmpK236-poriineja koodaavat sekvenssit puolestaan vastasivat tietokannan referenssisekvenssejä täydellisesti. ”Knock out”-mallin kohdalla tämä tarkoitti sitä, että resistenssiin aiemmin yhdistettyjä mutaatioita ei näiden isolaattien koodaamisessa, tavanomaisissa laajan läpimitan omaavissa poriineissa havaittu. Moniresistenssipumppuja koodaavien geenien (*EmrAB-ToIC*, *EmrYK-ToIC*, *mdf(A\_1)*) tai näiden toimintaa säätelevissä repressoreissa havaittujen mutaatioiden (*acrR*) merkityksiä isolaattien Burkina\_2 ja Mali\_1 fenotyyppissä ilmenevän resistenssin kannalta ei voitu tunnistaa muun muassa lukuisten muiden resistenssigeenien läsnäolosta johtuen.

näyte	Burkina 1		Burkina 2		Mali 1	
	geeni	vastaava fenotyyppi	geeni	vastaava fenotyyppi	geeni	vastaava fenotyyppi
ulkomembraaniporinit ( <i>K. pneumoniae</i> ):	<i>ant(3'')-Ia</i>	aminoglykosidit	<i>ant(3'')-Ia</i>	aminoglykosidit	<i>aac(3)-IIa</i>	aminoglykosidit (gentamysiini)
	<i>aph(3'')-Ib</i>	aminoglykosidit	<i>aph(3'')-Ib</i>	aminoglykosidit	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	fluorokinolonit(siprofloksasiini)
	<i>aph(6)-Id</i>	aminoglykosidit	<i>aph(6)-Id</i>	aminoglykosidit	<i>aadA1</i>	aminoglykosidit
	<i>CTX-M-15</i>	ESBL, inhibiittoriresistentti	<i>OKP-B-6</i>	ampisilliini	<i>aph(3'')-Ib</i>	aminoglykosidit
	<i>SHV-1</i>	ampisilliini	<i>TEM-1B</i>	ampisilliini	<i>aph(6)-Id</i>	aminoglykosidit
	<i>TEM-215</i>	ampisilliini	<i>dfrA14</i>	sulfa-trimetopriimi	<i>CTX-M-15</i>	ESBL
	<i>fosA_5</i>	ei testattu (fosfomysiini)	<i>fosA_5</i>	ei testattu (fosfomysiini)	<i>OXA-1</i>	ampisilliini
	<i>oqxA</i>	siprofloksasiini	<i>qnrS1</i>	siprofloksasiini	<i>TEM-1B</i>	ampisilliini
	<i>oqxB</i>	siprofloksasiini	<i>tet(A)_4</i>	tetrasykliini	<i>catB3</i>	ei testattu (kloramfenikoli)
	<i>sul2_2</i>	sulfa-trimetopriimi			<i>dfrA1</i>	sulfa-trimetopriimi
	<i>tet(A)_6</i>	tetrasykliini			<i>sul2_2</i>	sulfa-trimetopriimi
					<i>mdf(A)_1</i>	moniresistenssi
					<i>tet(D)_1</i>	tetrasykliini
ompK35	täydellinen		täydellinen			
ompK36	täydellinen		täydellinen			
ompK37	tarkka		tarkka			
moniresistenssipumput ( <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> ):			mutaatio AcrAB-ToIC moniresistenssipumpun repressorissa ( <i>acrR</i> )		EmrAB-ToIC - ja EmrYK-ToIC -moniresistenssipumput	